MANUAL DE MICROSCOPIA

Marcel Locquin
Maurice Langeron

Labor

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

Marcel Locquin
Maurice Langeron

MANUAL DE MICROSCOPIA

EDITORIAL LABOR, S. A.

Traducción:

Dra. Mercedes Durfort Coll
Profesora titular de
Citología e Histología
de la Facultad de Biología
Universidad de Barcelona

Primera edición: 1985

Traducción autorizada de la edición en lengua francesa:
Manuel de Microscopie
© Masson, Editeur, París, 1978
© Editorial Labor, S. A. - Calabria, 235-239 - 08029 Barcelona (1985)
Depósito legal: B. 443-1985
ISBN: 84-335-0024-4
Printed in Spain - Impreso en España
Impreso en I.A.G. Grafink, S. A. - Ripollet (Barcelona)

PRÓLOGO

El malogrado MAURICE LANGERON y yo compartíamos dos pasiones: la microscopia y la micología. Después de haber mantenido correspondencia antes de la última guerra, lo encontré en París y nuestras aficiones comunes hicieron que pronto contactásemos y nos diésemos cuenta de que teníamos una gran afinidad. En el transcurso de nuestros encuentros, iniciados en 1946, que pronto fueron semanales, pasábamos revista a los avances espectaculares de la microscopia y de sus aplicaciones biológicas, sobre todo a la parasitología y a la micología. Antes de que apareciera la séptima edición de su ya clásico *Précis de Microscopie*, que sería la última edición redactada por él, habíamos llegado al acuerdo sobre la necesidad de preparar una octava edición, totalmente renovada, dándole un enfoque inédito. Su muerte no me permitió llevar a cabo con M. Langeron la realización de esta nueva obra.

Junto con Albert Policard y Marcel Bessis habíamos emprendido la redacción y publicación en 1957 de un *Tratado de Microscopia* que no tenía la pretensión de sustituir el Tratado de Langeron, ni siquiera ser una continuación, dado que el Langeron es insustituible por la gran información que conlleva.

El hecho de que estas dos obras editadas por Masson y Cía., se encuentren actualmente agotadas y que la microscopia fotónica haya evolucionado, al cabo de veinte años, me hicieron reemprender el plan que habíamos forjado, tranquilamente aislados en su laboratorio de la calle de L'École de Médicine y decidí llevarlo a término, con la inapreciable colaboración de nuestro común editor.

Cuando el usuario del microscopio se encuentra frente a un nuevo objeto en su investigación, frecuentemente se halla perdido, confuso. Si bien en la bibliografía encontrará sin dificultad, si tiene suficientes conocimientos anatómicos y sistemáticos, otro objeto, de estructura análoga, a partir del que pensará poder poner a punto un método de estudio eficaz. Continuando sus búsquedas bibliográficas, se halla pronto sumergido en un mundo de perplejidades: ¿cómo escoger el mejor fijador, entre los centenares de fórmulas publicadas?, ¿los mejores colorantes entre millares?, muchos de los cuales son homónimos o sinónimos, ¿cómo escoger una o dos técnicas de aplicación, entre las decenas de miles publicadas, sin contar sus variantes? Buscando en las obras enciclopédicas tales como los McClung, los Bolles Lee se perderá si no tiene un determinado criterio que lo guíe, si no tiene una sólida práctica en histología y en citología; hojeando obras especializadas pronto quedará desconcertado por la pluralidad de técnicas convergentes o decepcionado por la omisión de los textos de detalles esenciales para el logro de sus manipulaciones. Si busca un hilo lógico, puede hallarlo disperso en diversas obras, más fisicoquímicas que biológicas y necesitará un gran esfuerzo de síntesis en el que, a menudo, está poco preparado para extraer lo esencial.

Por esta razón, a pesar del justificado pesimismo señalado por Gabe en 1968, en cuanto a la redacción de un nuevo Manual de Microscopia, que reúna en una obra manejable, a la vez que la elección lógica entre los millares de recetas tintoriales anteriormente mencionadas, la descripción de una presición operativa concreta, sin omitir ningún detalle para que salgan bien y con espíritu crítico bastante audaz para ir contra corriente respecto a ciertos métodos inútiles, incluso nefastos y enfatizar, en otras ocasiones, el valor de técnicas muy útiles pero olvidadas, emprendí, finalmente, la redacción, tan esperada por los lectores de lengua francesa, de este nuevo Manual de Microscopia, aunque lamentablemente tuve que enfrentarme a esta aventura solo, dado que Langeron ya había fallecido.

En los catálogos de la editorial Masson figura al lado del interesantísimo tratado de Gabe: *Técnicas Histológicas,* que lo completa extraordinariamente en el dominio más concreto de la histoquímica.

Esencialmente, contiene las técnicas de aplicaciones biológicas unidas directamente al microscopio fotónico, dejando las técnicas cuantitativas a las obras más específicas, como la anteriormente citada.

Con relación a las obras homólogas contemporáneas, que están, curiosamente, casi todas agotadas y no reeditadas, se distingue por sus elecciones críticas, sus exposiciones progresistas y su extensión.

Elecciones críticas dado que he eliminado las técnicas dobles, escogido los mejores reactivos, sin dudar de ir a veces en contra de las modas contemporáneas, como las que hacen preferir, inexplicablemente, el alcohol a la acetona, el tolueno al benceno, los fijadores de Hollande o de Zenke al de Bouin y Kopsch-Regaud, por operaciones de rutina practicadas en casi todos los laboratorios —elecciones progresistas también, ya que a partir del mejor reactivo o de la mejor técnica operatoria, cito las variantes más utilizadas y sus adaptaciones más específicas—. En cuanto a la extensión de la obra debemos indicar que gracias a los cuadros generales, gracias a las referencias de las nociones generales indispensables, debido a una revisión metódica de casi todos los métodos fundamentales utilizados en microscopia fotónica contemporánea, espero que este Manual permita a todo lector, sea cual fuere su especialidad, encontrar la información necesaria tanto para la posible aplicación, en sus investigaciones, de técnicas conocidas como de técnicas muy recientes.

MARCEL LOCQUIN

OBSERVACIONES

La selección de informaciones para reunir en un Manual como éste, esencial para hacer una microscopia contemporánea, requiere un trabajo arduo, constantemente actualizado. El malogrado Maurice Langeron consagraba cada día por lo menos ¡una hora! Actualmente la sistemática revisión de los grandes periódicos de análisis (Abstracts) permite una selección bastante completa de publicaciones por poco que nos informemos en todas las disciplinas que utilizan el microscopio. Pero la mejor fuente de información se obtiene en la consulta de obras de síntesis, de las actas de los coloquios o congresos y de la lectura de importantes revistas especializadas en microscopia. En microscopia fotónica no hay ninguno más reciente en lengua francesa, mientras que en microscopia electrónica hay uno ampliamente ilustrado. Una encuesta periódica y sistemática de muestreo efectuada en laboratorios de microscopia, permite testar las técnicas y los métodos. Este muestreo es transnacional, dado que debemos evitar todo chovinismo en esta cuestión y buscar la mejor técnica que se practica. Numerosos son los laboratorios que nos han ayudado en esta búsqueda y selección para que podamos agradecérselo uno a uno. Efectivamente, hace mucho tiempo que Langeron había renunciado, antes de que apareciera la quinta edición de su Tratado, a verificar personalmente el interés de las técnicas que citaba. Para asegurarnos de la elección de la mejor calidad posible de las numerosas técnicas citadas, Marcel Locquin asistió personalmente a la aplicación de las mismas en un laboratorio especializado, siempre que no las hubiera practicado él mismo. Practicó personalmente la química de los colorantes y de los fijadores en el Instituto de Química de Lyon y en Rhône Poulenc, la óptica en el Instituto de Óptica dirigida por Françon y Nomarski, la colorimetría y la microscopia electrónica en el laboratorio de Física del Museo del Prof. Y. Le Grand, con el microscopio en cuanto instrumento en la casa Wild, la fotografía en la Sociedad Lumière, la cinematografía en el Colegio de Francia con J. Dragesco, la telemicroscopia con la Sociedad Thomson y con la Philips, el contraste de fases y el contraste interferencial con la Sociedad Wild, la polarización con M. M. Cotton y Manigault en Bellevue, la espodografía en el laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de Lyon con A. Policard, la espectrografía de centelleo en el laboratorio de la identidad judicial con el Prof. Sannié, las lámparas en la Sociedad Claude Paz y Silvia, los tratamientos de superficies y de filtros interferenciales con la Sociedad GAB, los sistemas de iluminación, así como los láseres, con la Sociedad Orthotron, las técnicas vegetales y micrológicas en el laboratorio de criptogamia del Museo con el Prof. R. Heim, las técnicas palinológicas y micropaleontológicas en los laboratorios del Museo con G. Deflandre, de Micropaleontología de la Universidad de París VI con la Dra. Taugourdeau y M. Lashkar, en el laboratorio de la Escuela práctica de Altos estudios con M. Taugourdeau, las técnicas hematológicas y citológicas del laboratorio del Centro de transfusión sanguínea con M. Bessis, las técnicas de documentación con la Fototécnica y M. Cordonnier, la microfotometría con la Sociedad Europélec, las técnicas parasitológicas y micológicas del Instituto de Parasitología con M. Langeron, las técnicas protistológicas en el Colegio de Francia con E. Fauré Fremiet, las técnicas de automatización en el análisis de imágenes en el CENFAR con el Dr. Le Gô. Desde estas líneas, expresamos nuestro agradecimiento más sincero a todos ellos, sin olvidar a sus colaboradores, que han facilitado mi tarea.

Dado que la edición francesa es de 1978, nos ha parecido necesario añadir al texto francés unas sesenta novedades técnicas, en especial las que se refieren al estudio de los microfósiles conservados en estado de materia orgánica, particularmente útiles en estratigrafía y en investigaciones mineras.

Abreviaciones

Unidades: Micrómetro: μm; milimicra: mμ; Ångström: Å; litro: l; mililitro: ml (= cm^3); grado térmico: °; grado de alcohol: °; normalidad de un ácido o de una base: N; acidez-basicidad: pH; potencial de oxidorreducción: r_H; longitud de onda: λ; hora: h; peso gramo: g; contraste: γ; densidad óptica: δ; segundo: sec; minuto: min.
Átomos: es la lista de abreviaciones convencionales en química: Na, K, Mg, Cr, etc.
Moléculas: la misma observación. Salvo el agua: ac.
Otros: dest. = destilada; MEB = SEM = microscopio electrónico de barrido; MET = TEM = microscopio electrónico de transmisión; U.V. = ultravioleta; I.R. = infrarrojo; R. X. = rayos X; abs. máx.: máxima absorción; p. m. = peso molecular; ∞: infinito; K = grado Kelvin; soluc. = solución; aa = cantidades iguales.

PRÓLOGO A LA EDICIÓN ESPAÑOLA

No se enseña bien sino lo que
se hace, y quien no investiga
no enseña a investigar.

Santiago Ramón y Cajal

Quienes nos dedicamos a la práctica y la enseñanza de la microscopia hemos de saludar con interés la aparición de la presente obra, maestra en su género. En primer lugar, porque la bibliografía de las técnicas histológicas y microscópicas es escasa, sin que hubiese en castellano ninguna aportación reciente. En segundo término, porque el presente texto destaca entre sus congéneres por la amplitud, el rigor, la claridad y la utilidad de la información en él contenida.

Habrá a quienes les parezca un poco nostálgico publicar en 1984, en pleno auge de la microscopia electrónica y de los trabajos ultraestructurales, un libro de técnicas eminentemente ópticas. Lo cierto es, sin embargo, que la microscopia fotónica goza de excelente salud, es de uso generalizado y presenta algunas características que la hacen insustituible. Quizá la principal sea la posibilidad de observación vital, mediante las técnicas del contraste de fases o del campo oscuro, pues, como es sabido, los condicionantes del microscopio electrónico, especialmente la exigencia de que la muestra se encuentre en el vacío, son contradictorios con la existencia de vida. Esto resulta de importancia decisiva a la hora de enfrentarse con el problema metodológico más antiguo y esencial de la microscopia: la certeza de que lo observado es la realidad originaria y no ningún artefacto o producto artificioso de las manipulaciones necesarias y previas a la observación. Por otro lado, los estudios ultraestructurales no suplantan, sino que requieren y complementan, la observación con el microscopio óptico. Han de ser su culminación, pues, de lo contrario, el investigador se hallaría en un bosque impenetrable y le resultaría muy difícil dar con la interpretación adecuada de lo observado.

Marcel Locquin, dando un ejemplo admirable de amistad y de colaboración intelectual, continúa en este libro la ejecución de un proyecto emprendido hace tiempo con Maurice Langeron, y que ya se concretó en dos publicaciones decisivas, como él mismo explica en el Prefacio. Tras una revisión de los principios ópticos de la formación de imágenes, examina los diversos instrumentos y sus métodos de utilización, incluyendo técnicas muy especializadas de observación, iluminación y registro de imágenes, sin olvidar los microscopios electrónicos de barrido y de transmisión, o el protónico. A continuación, se tratan los métodos y reactivos necesarios para la fijación, la obtención de cortes, tinción, montaje y examen de las muestras. Aparte de lo exhaustivo de los datos, yo querría resaltar su precisión y su utilidad práctica. Hay que destacar, además, su amplitud poco usual, ya que abarca no sólo los tejidos vegetales y animales sino otros materiales no estrictamente biológicos, como los que estudia la micropaleontología. Como corresponde a la importancia que tienen en microscopia, los diversos colorantes y las técnicas de tinción e impregnación reciben una atención especial, que, en el caso de los colorantes, incluye sus características físicas y químicas y, en muchos de ellos, sus fórmulas estructurales.

Mencionemos, en fin, que la edición española ha sido aprovechada por el autor para una nueva puesta al día, lo que añade mayor interés, si cabe, a este Manual de Microscopia, tan completo, útil y lleno de rigurosa información.

MERCEDES DURFORT

ÍNDICE DE MATERIAS

PRÓLOGO V
OBSERVACIONES VI
ABREVIACIONES VI
PRÓLOGO A LA EDICIÓN ESPAÑOLA VII

1. — *Instrumentos y técnicas instrumentales* 1
I. — PRINCIPIOS BÁSICOS 2
Luz y colores 2
La formación de la imágenes 5
Consideraciones mecánicas 6
Las aberraciones 6
La profundidad de campo 7
La esfericidad de campo 7
La imagen microscópica en óptica ondulatoria 7
El aumento útil 9
La inmersión homogénea de los objetivos 10
Los tratamientos antirreflectantes 11

II. — INSTRUMENTOS BÁSICOS 11
A. — *La mecánica del microscopio* 11
Los microscopios invertidos 13
Estereomicroscopios y microestereoproyectores 13
Principales fuentes de luz 15
Las lámparas de iluminación electrónicas en fotomicrografía 18
B. — *Empleo del microscopio* 19
Forma de coger y de transportar el microscopio 19
Colocación del microscopio 19
Instalación del microscopio 19
Enfoque del microscopio 19
Enfoque de los objetivos de inmersión 20
Causas de error en el enfoque 21
Maniobras con el tornillo micrométrico y observación microscópica 21
Elección de los objetivos y de los oculares 24
C. — *La observación microscópica* 24
Condiciones de la observación microscópica 24
Consecuencias prácticas 27
Precauciones a tomar en un laboratorio de microscopia 28
Variación de la intensidad lumínica 29
Métodos fundamentales de iluminación en campo claro 30
Diagnóstico sistemático de las causas de una mala imagen 32

III. — PRINCIPALES MÉTODOS INSTRUMENTALES 34
Observaciones en campo oscuro 34
Observación con luz reflejada 35
Microscopia de infrarrojo 39
Microscopia con ultravioleta 39
Los moduladores pupilares 40
Los microscopios interferenciales 42
El contraste de fases 43
El microscopio de luz polarizada 45
Estudio de las anisotropias biológicas en luz polarizada 50
Estructuras en contraplacado y en mosaico 52
Dicroísmo metacromótropo 52
Inmunofluorescencia 54
Catodoluminiscencia 54
Microelectroluminiscencia 54
Doble fluorescencia 54
Debilitamiento o amortiguamiento de las fluorescencias 54
Telemicroscopia 54

IV. — TOMA DE IMÁGENES 56
La fotomicrografía 56
La fotomacrografía 59
La iluminación en fotomicrografía 60
Los filtros de colores 61
Diferencias cromáticas de la emisión y de la recepción 64
Manera de proceder para la obtención de imágenes en blanco y negro 64
Manera de proceder para la obtención de imágenes en color 65
Compensación equilibrada de colores 65
Variaciones y defectos de las emulsiones de color 66
Las emulsiones 66
El tiempo de exposición 67
Área de medida del tiempo de exposición 67
Revelado 67
Positivado 68
Archivo 68
Transposición de contraste 68
Efectos especiales en fotomicrografía . 68
La equidensitometría 69

V. — SÍNTESIS 70
Las fotosíntesis oculares y fotográficas 70
Las fotografías estereoscópicas 71
Las reconstrucciones de gráficas 71
Las reconstrucciones plásticas 71
Las reconstrucciones cinematográficas 71
La cinemicrografía 72
El dibujo en microscopia 73
Los artefactos 76

VI. — MEDICIONES 76
Métodos de medición 76

VII. — TÉCNICAS ESPECIALES 81
La localización de las estructuras 81
Las platinas especiales y sobreplatinas 81
Examen microscópico bajo altas presiones 82
La automatización en el microscopio... 82
Microcirugía 83

VIII. — UTILIZACIÓN DE LA LUZ MONOCROMÁTICA 89
Los monocromatores 89
Los espectrógrafos 89

Microespectrografía a destello y espectrografía de emisión 90
Los microfotómetros y microespectrofotómetros 90

IX. — Microanálisis estereológico 92
Numeración 92
Morfometría y estereología 94
Los microcuantímetros 95

X. — Microanálisis fisicoquímico 96
Microelectroforesis de células 96
Micrométodos térmicos 97
Microrrefractometría 97
Autorradiografía 99
Historradiografía 100
Espodografía 100

XI. — Microanálisis electrónico 101
Microscopio electrónico de barrido 101
El microscopio electrónico de transmisión 107
Microscopio electrónico de alto voltaje 110
Microscopio electrónico de excitación ultravioleta 110
Microscopio protónico 110
Microscopio iónico 110
Espectroscopia Raman 110
Microespectroscopia Raman Láser 111
Microanalizador iónico 111
Emisión iónica secundaria 111
Microsonda nuclear 111
Pirólisis por espectrografía de masa ... 111

XII. — Microdeterminaciones físicas 112
Microdeterminación de la presión osmótica 112
Las técnicas de separación diferencial 112
Ultracentrifugación de células 113
Determinación del peso seco de los componentes celulares 113
Determinación de los componentes por absorción específica 114

2. ***Métodos de fijación, de observación, de corte y de montaje*** 115

I. — Métodos de preparación 116
Las preparaciones test o de referencia 116
Regeneración del material desecado . 117
Mezclas conservadoras 118

II. — Métodos de fijación 119
La fijación 119
Las funciones de la fijación 119
Grado de fiabilidad de los fijadores ... 120
Los fijadores simples 120
Las mezclas fijadoras 124
Compatibilidades 126
Tiempos de fijación 126
Los fijadores citológicos 127
Compatibilidades de inclusión 128
Penetrabilidad 128
Compatibilidades con las tinciones 129
Descalcificación 129
Volumen a utilizar 129
Elección en función del material a estudiar 129
Finalización de la fijación 129
Fijadores de estructuras ultramicroscópicas 130

III. — Transparentado 131
Desmineralización y reblandecimiento 131
Ablandamiento de la queratina y de la quitina 131
Maceración 132
Despigmentación 132

IV. — La observación vital 133
El examen vital 133
Las tinciones vitales 133
Métodos de preparación para la observación *in vivo* de microorganismos 135
Los medios equilibrados 139
Osmodiálisis 142

V. — Técnicas especiales 143
Preparaciones delgadas por pulimento o desgaste 143
Disociaciones 143
Preparación fisicoquímica de los sedimentos 144
Destrucción de la materia orgánica, salvo las esporas y los granos de polen 144
Separación por cristalización 144
Preparación de lignitos 144
Preparación de carbones 144
Preparación de granos de polen a partir de aceites, asfaltos y betunes 145
Los intensificadores de contraste 145
Desecación, deshidratación 145
Deshidratación en un medio líquido ... 146
Reactivos aclarantes desalcoholizadores 147
Reactivos deshidratantes que permiten pasar directamente a la parafina 147
Reactivos aclarantes que permiten pasar del etanol de 95° a la parafina 147

VI. — Los métodos de inclusión 148
Medios de inclusión no acuosos 148
Medios de inclusión acuosos 148
Inclusión en parafina 148
Inclusión en celoidina o en colodión ... 152
Inclusión con resinas epoxy, con metacrilato y con poliésteres 153
Inclusión en medio hidrófilo 154
Inclusiones mixtas: gel-parafina 155

VII. — Obtención de los cortes 155
Los micrótomos 155
Aparatos automatizados para afilar las cuchillas 160
Microtomización 161
Fracasos y soluciones al cortar en congelación 164
Planchado y adhesión de los cortes 166
Cortes malos de parafina: causas y soluciones 167
Desparafinado previa tinción 170
Cortes ultrafinos para la microscopia electrónica de transmisión 170
Preparación de las membranas soporte para microscopia electrónica 171
Fijación-conservación de piezas de pequeño volumen 171

VIII. — Montaje de las preparaciones 172
La preparación microscópica 172
Medios de montaje temporal 174

Medios de montaje permanentes 175
Índices de visibilidad 178
Cementado: betunes y barnices 178

3. *Colorantes* 181
I. — Principales colorantes 182
Antraquinonas 182
Azinas 182
Azoicos (Mono-) 183
Azoicos (Poli-) 183
Cianinas, Quinoleínas 185
Diazonio, tetrazonio, tetrazolio 185
Indolinas 186
Nitrocolorantes 186
Oxacinas 187
Pirazolonas 187
Quinonaoximas 187
Fitalocianinas 187
Tiacinas 187
Triarilmetanos 188
Xantenos 190
Thiazoles 191
Polimetinas 191
Colorantes de tipo mineral 191
Colorantes naturales 192
Fluorocromos 192

II. — Sinonimia de los principales colorantes 194

4. *Tinciones e impregnaciones* 215
I. — Metodología 216
Generalidades 216
Observaciones 216
Materias colorantes 218
Modalidades 218
Colorantes neutros 219
Tinciones en bloque 220
Tinciones negativas 221
Infiltración, inyección 221
Automatización de las tinciones 222

II. — Aplicaciones 222
Tinciones subespecíficas 222
Tinciones de los elementos tisulares ... 222
Tinciones relacionadas con la detección del poder reductor 223
Compuestos minerales 223
Búsqueda de cationes 224
Búsqueda de aniones 226
Búsqueda simultánea de cationes y de aniones 227
Búsqueda global de aniones 228
Eosinofilia a acidofilia 228
Cianofilia o basofilia 229
Tinciones de los grupos aldehídicos ... 229
Tinción de los fenoles naturales y artificiales 230
Tinción de los tejidos que contienen lípidos 232
Tinción de proteínas 234
Tinción de los tejidos que tienen poliósidos 235
Colorantes de las oxidadas 237
Tinción de los ácidos nucleicos 237
Yodofilia 238

5. *Tinciones topológicas*
I. — Métodos panópticos generales 242
Tinción de núcleos con lacas progresivas de hematoxilina 242
Tricrómicos o dicrómicos 243
Protocolo a seguir 244

II. — Métodos especiales utilizados en histología animal 245
Tinción de la sangre y de los parásitos endocelulares 245
Tinción de los tejidos óseo y cartilaginosos 246
Tinción de las fibras musculares 247
Tinción del sistema nervioso 247
Tinciones bacteriológicas 249
Tinción de los tejidos que contienen colágena 251
Tinción de glucógeno y de galactógeno 251
Tinciones de estudio para los tegumentos 252
Los pigmentos 252

III. — Técnicas especiales utilizadas en histología vegetal 258
Esporas y quistes 258
Técnicas vegetales 258
Técnicas mico-fito-patológicas 267
Tratamiento de rocas para la separación de esporas, granos de polen y microfósiles, conservados en estado de materia orgánica 269
Preparación de colecciones palinológicas 269
Estudio de microfósiles 269
Microsublimación e identificación de sustancias liquénicas 272
Detección citoquímica de los componentes de las paredes 272
Solubilización de los componentes de las paredes celulares 273

IV. — Métodos especiales utilizados en protozoología 273
Técnicas protistológicas 273
Amebas 274
Esporozoos 278
Flagelados 290
Ciliados 296
Espiroquetas y organismos espiralados 301

V. — Métodos micológicos en zoopatología 309
Técnicas zoopatológicas 309

VI. — Observaciones complementarias 316
Observación sobre las técnicas eliminadas 316
Automatización de la fijación-impregnación-tinción 316
Confección de grandes series para la enseñanza 317

6. *Tinciones citológicas sin especificidad citoquímica* 319
I. — Citología general 320
II. — Tinción de los orgánulos citoplasmáticos 323
III. — Citodiagnóstico carcinológico 324
IV. — Conclusión 327

7. *Anexos* 329
I. — Vocabulario técnico 330
II. — Constantes fisicoquímicas 342
III. — Referencias bibliográficas 355
IV. — Índice alfabético 362

1/
INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS INSTRUMENTALES

I. — PRINCIPIOS BÁSICOS

LUZ Y COLORES

La luz que emana de cualquier objeto puede ser analizada de diferentes formas. Para ello debe utilizarse una serie de unidades que pasamos a definir:

c = velocidad de la luz en el vacío = 299,776 km/segundo

λ = longitud de onda = $\frac{c}{\nu}$ siendo ν la frecuencia

$\mu m = \mu$ = micrómetro $\nu = 10^{-4}$ cm

$m\mu$ = milimicrómetros = 10^{-7} cm

Å = Ångström = 10^{-8} cm

m = índice de refracción; n_{D20} = índice de refracción para la banda D amarillo de sodio a 20 °Celsio.

En la figura 1 se ha representado la escala de radiaciones entre las que se encuentra la octava

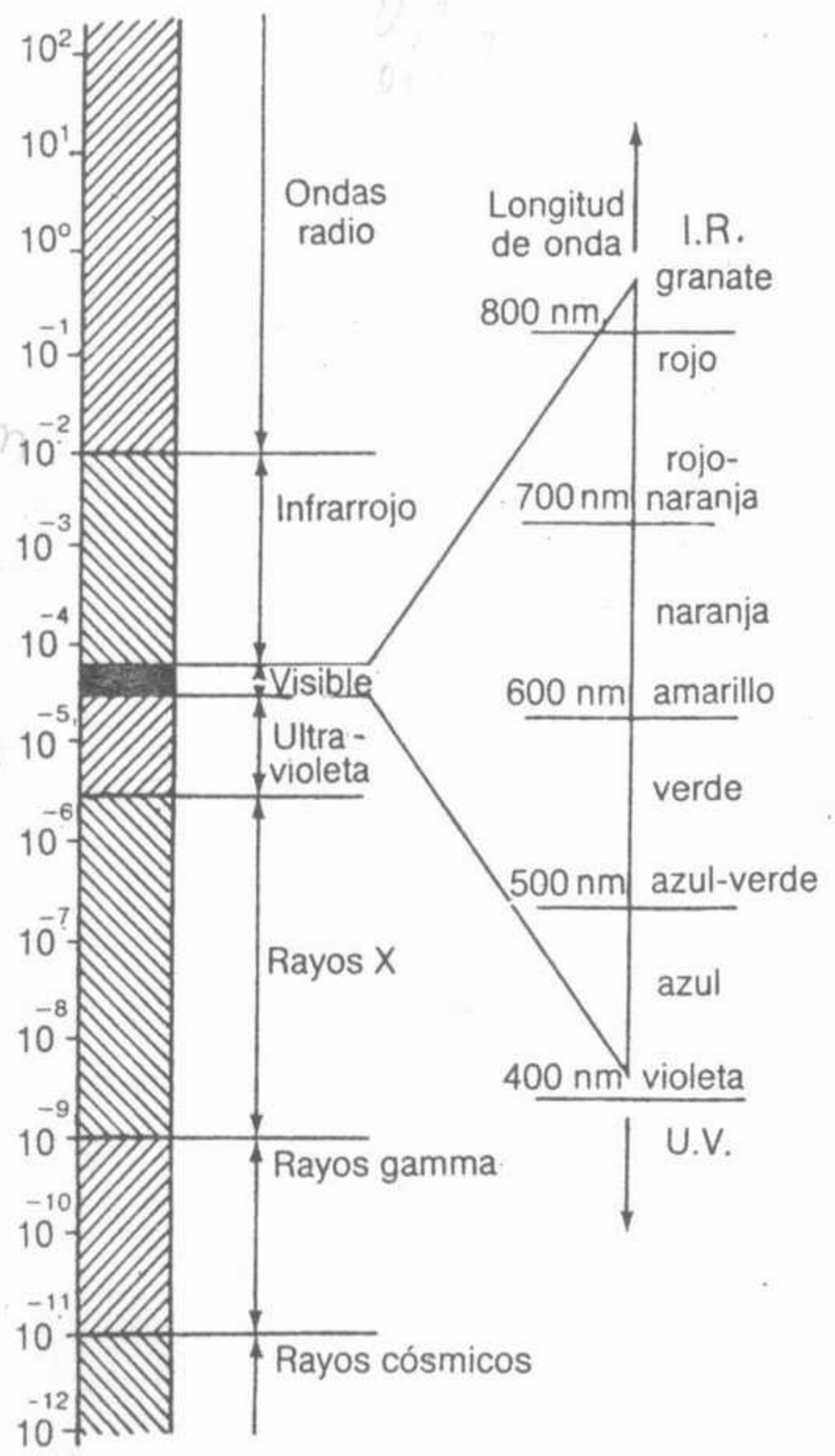


FIG. 1. — *Escala de radiaciones*. A la izquierda, longitud de onda en metros; en el centro: sectores convencionales del espectro; a la derecha: parte visible del espectro y franjas convencionales del color.

de radiaciones visibles a nuestro ojo, una sesentava parte del total. En microscopia la observación con ultravioleta e infrarrojo representa únicamente un incremento de tres octavas partes.

Los ensayos sobre interferencia y los de difracción de Young y de Fresnel llevados a cabo a principios del siglo XIX demostraron la existencia en la luz, de un elemento que variaba periódicamente, tanto en el tiempo como en el espacio. Así, en un punto dado, la luz tiene el mismo valor durante un considerable número de veces por unidad de tiempo; se trata de su frecuencia ν o período por segundo. En el espacio, la distancia que separa dos superficies de onda que tienen el mismo estado luminoso, es la longitud de onda λ. Los dos parámetros están relacionados por la fórmula $\lambda = \frac{c}{\nu}$.

El aspecto periódico, ondulatorio de la luz, no permite interpretar fácilmente los procesos de emisión y de absorción de la luz, si bien permite apreciar los fenómenos de propagación. Para poder interpretarlos de forma adecuada debe admitirse una discontinuidad, una cuantificación de la energía transportada por la luz. Tal como demostró Max Planck en 1905, esta cuantificación es múltiplo de una cantidad elemental denominada cuanto de energía: $\varepsilon = h\,\nu$. Cada cuanto está presente en la onda lumínica bajo forma de un fotón que es su corpúsculo elemental que no puede existir en reposo. Siguiendo la definición de Yves le Grand, la luz es hasta cierto punto por un «chorro de partículas móviles».

Los **manantiales de luz puntual** son fuentes lumínicas apreciadas por el observador o por la pupila de entrada del instrumento formando un ángulo extremadamente pequeño, de algunos minutos de arco. Cuanto más puntual es el emisor de luz más «coherente» se dice que es la iluminación; más adelante veremos la trascendencia de este concepto.

Los **manantiales de luz difusa** pueden ser poco coherentes, parcialmente coherentes o incoherentes. Se llaman primarios si emiten luz por sí mismos, o secundarios si modifican parte de las radiaciones recibidas. El hecho de situar una superficie difusora delante de un foco coherente da lugar a un foco secundario incoherente. Es por ello que se evitará, en lo posible, utilizar este accesorio en aquellos casos en que deba mantenerse la coherencia del foco: en contraste de fases, en contraste interferencial o cuando se trabaja con luz polarizada. Debemos añadir que un haz

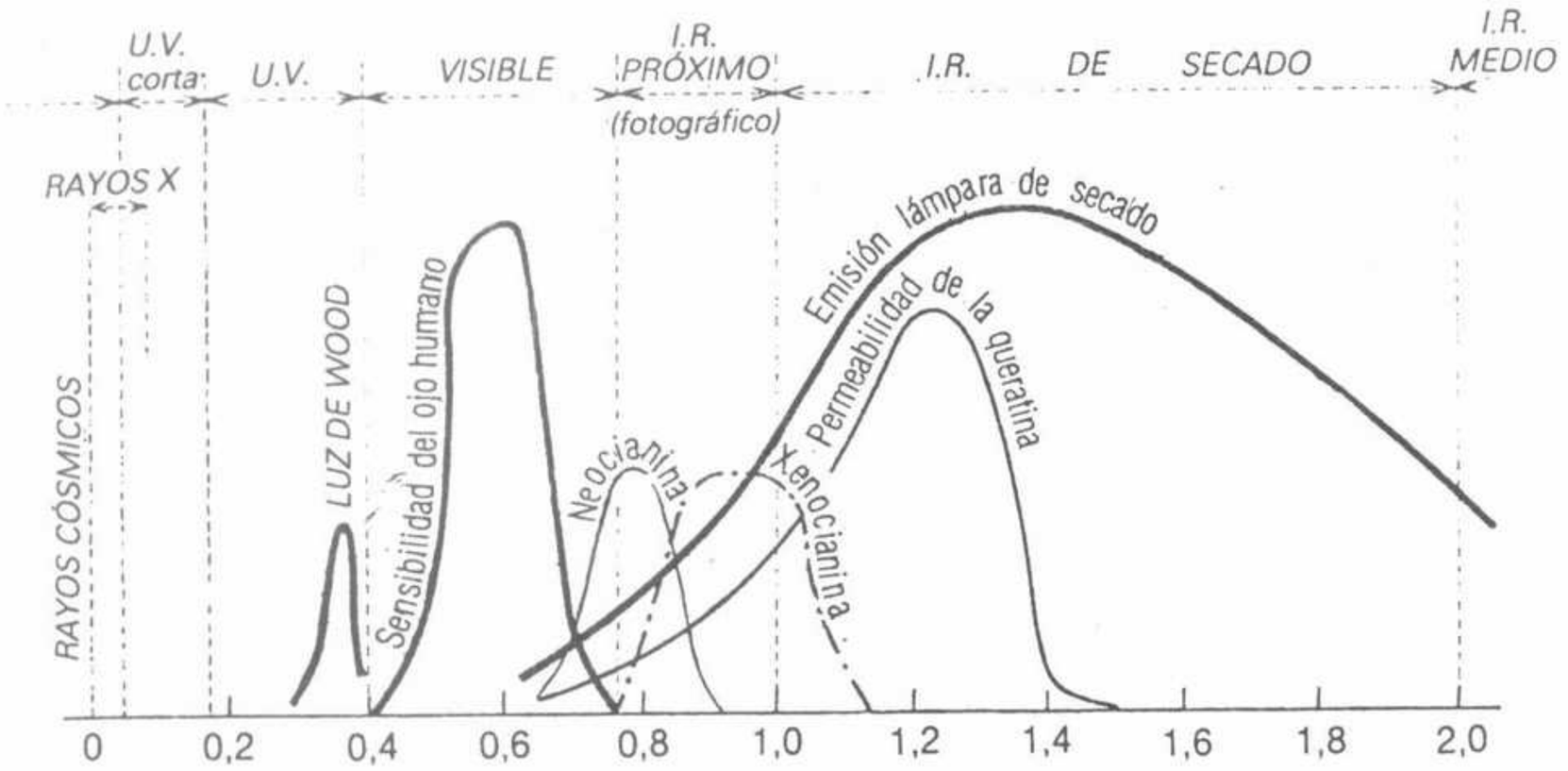


FIG. 2. — *Relaciones entre la franja infrarroja, visible y ultravioleta.* Según Deribéré, 1944.

de láser tiene una gran coherencia, lo cual hace posible una serie de fenómenos ópticos especiales como pueda ser la holografía.

El **resplandor** y el **brillo** son dos conceptos homólogos, mientras el primero se aplica a un volumen el segundo corresponde a una superficie. Únicamente puede interesarnos el resplandor del cielo o de una descarga en un gas, mientras que el brillo de las fuentes lumínicas tienen la máxima importancia en microscopia. Se ha demostrado que a igual abertura de un sistema óptico es el brillo del iluminador y sólo él quien determina la luminosidad de la imagen dada por el miscroscopio. El conseguir lámparas de brillo cada vez más elevado ha sido pues un factor determinante en el progreso de la microscopia.

El **rayo** emitido por la lámpara puede presentar dos estructuras distintas: puede ser continuo o bien discontinuo, en este segundo caso se habla de un espectro de bandas o rayas; algunas lámparas emiten los dos tipos de rayos o, mejor dicho, una mezcla de ambos. La excitación de un gas: sodio, mercurio, produce un espectro de rayas, el calentamiento de un filamento de tungsteno tiene un espectro continuo. Un espectro continuo se caracteriza por su curva espectral de energía, un espectro de bandas por la longitud de onda y la intensidad de cada banda.

El **ojo** es un receptor fundamental de radiaciones, prácticamente no existe ningún aparato óptico que pueda funcionar sin que un ojo explore directa o indirectamente la imagen que da, estudiando los resultados fotografiados o registrados.

Las **fotocélulas** o fotosensores, pertenecen a

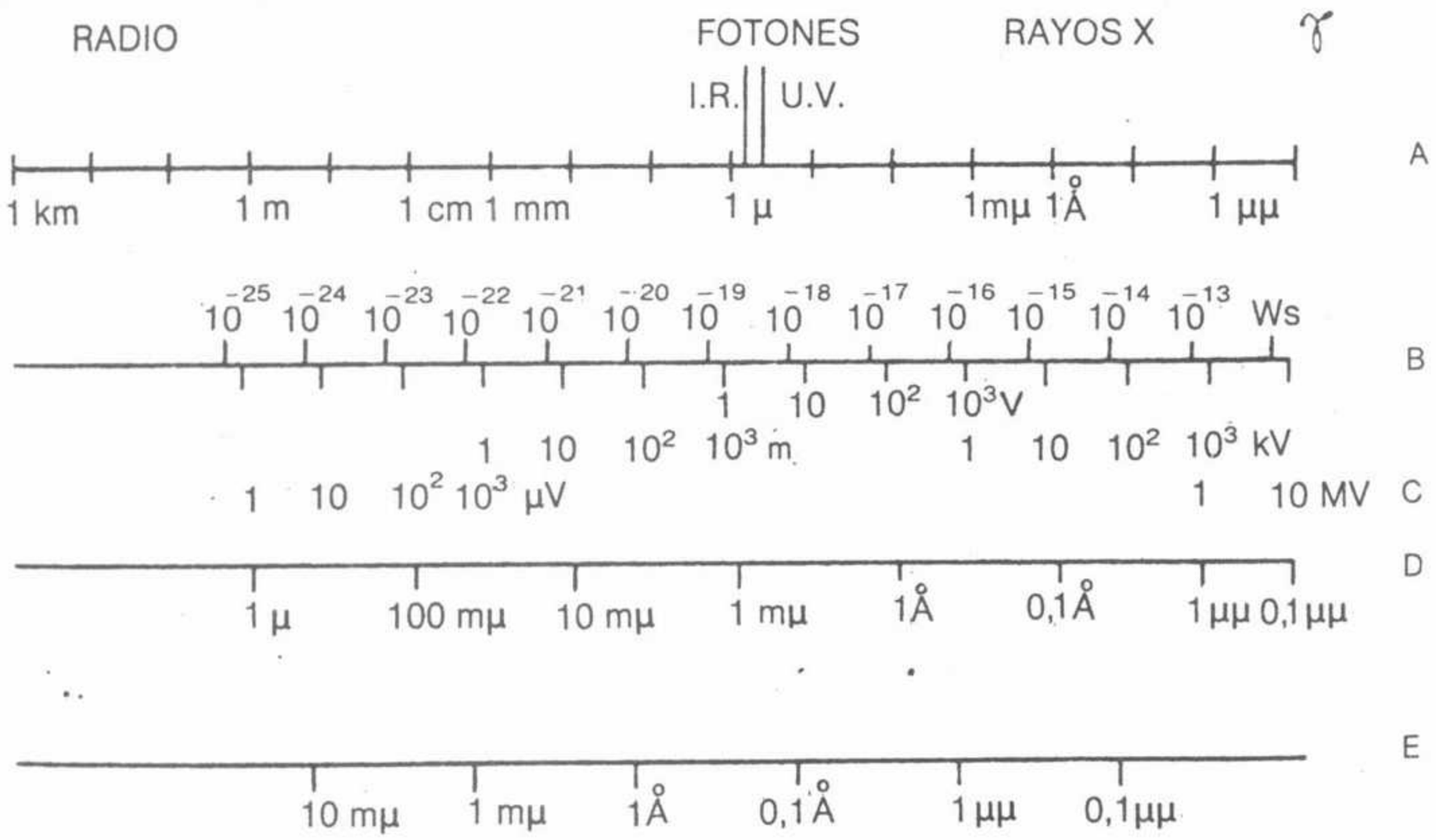


FIG. 3. — *Datos físicos sobre las ondas y partículas utilizadas en microscopia.* A, longitudes de onda; B, cuantos de energía; C, aceleración de los electrones; D, longitud de onda asociada a los electrones; E, longitud de onda asociada a los protones.

distintas categorías, atendiendo a la manera de funcionar. No entraremos en detalle, son ampliamente tratados en manuales de electrónica y de opticoelectrónica.

Las **superficies fotosensibles** frecuentemente atendiendo a sus estructuras, registran las densidades en negro y blanco o los colores.

Estos receptores tienen una característica en común: únicamente registran las amplitudes o grados de gris en la imagen, pero nunca las fases.

En óptica, un concepto de un interés teórico considerable es el de los **cuerpos negros**. En microscopia es útil como punto de referencia para tratar diversas cuestiones. Generalmente las estructuras que se observan al microscopio son cuerpos negros.

Las **lámparas de incandescencia** poseedoras de un filamento calentado por efecto Joule son todavía las fuentes lumínicas más habitualmente empleadas en microscopia. Su curva espectral de energía varía rápidamente con el amperaje (figura 21). Su *temperatura de calor* es una forma fácil de marcar la longitud de onda dominante de su espectro de energía.

La **heterogeneidad retiniana** limita el poder separador del ojo. Actualmente se sabe que los conos y bastones retinianos están relacionados entre sí por unas auténticas unidades integradoras, por lo que muchas hipótesis, que se han elaborado para deducir, a partir de sus dimensiones, el poder separador teórico del ojo, están totalmente desechadas.

El ojo tiene una **memoria** compleja espaciotemporal. Establece una aparente continuidad allí donde las imágenes discontinuas se suceden; en ello se basa la cinematografía. Parece ser que este proceso es más físico que fisiológico. Sería similar a lo que acontece con las discontinuidades en nuestro pensamiento consciente que enmascara una aparente continuidad de nuestra memoria, en fase de insomnio.

El **campo visual** es siempre más grande que el del instrumento por el que el ojo mira. El operador, para explorar rápidamente lo que ve, debe entrenarse con la «visión periférica». Debe poder prescindir voluntariamente de la visión central en provecho de la visión periférica, sin desplazar el globo ocular. Es totalmente indispensable adquirir el hábito de la rápida exploración de campo por campo, la lectura rápida de textos no es más que un caso particular de este fenómeno de acomodación.

Los **límites de lo visible** varían según los observadores y dependen de la intensidad de luz recibida. La máxima visibilidad pasa del amarillo al verde cuando se disminuye la intensidad.

Es ilógico pensar que la imagen ocular del microscopio sea análoga a un agujero de luz en el fondo de un túnel negro. A fin de obtener una mejor agudeza visual asociada a una mayor comodidad de observación debería haber una iluminación auxiliar débil en la periferia del campo. En microscopia todavía no se ha hecho ningún ensayo en este sentido.

Las radiaciones **ultravioleta** son nocivas para el ojo; a la vez que excitan la fluorescencia del cristalino y provocan la formación de una aureola azulada borrosa en las imágenes.

La **iluminación** a nivel de la retina regula por reflejo el diámetro de la pupila de entrada del ojo. Al microscopio este reflejo no influye sobre el flujo admitido por el ojo, dado que la pupila de salida del ocular con un diámetro generalmente es mucho más pequeño cuando se trabaja con mayor aumento. Ello explica por qué el ojo es fácilmente deslumbrado por una iluminación demasiado intensa. La sensibilidad de la retina cambia muy rápidamente cuando el haz incidente se separa del ojo ocular, es el efecto Purkinje. En realidad todo sucede como si el ojo estuviera formado por dos receptores funcionando diferentemente en cuanto a sensibilidad como con la longitud de onda en pleno día y durante el crepúsculo.

■ La mayoría de los objetos examinados al microscopio son: o bien pigmentados naturalmente o teñidos artificialmente. Por ello es absolutamente necesario recordar las siguientes nociones de colorimetría para obtener el máximo rendimiento de su instrumento.

El **color blanco** es blanco con relación a un patrón. Éste es convencional: es la luz diurna de 5200 K; se sabe que la «temperatura de color» varía ampliamente en el transcurso del día y de los meses.

Un rayo **monocromático** está enteramente determinado por su longitud de onda y su flujo.

Un **rayo de color** está totalmente definido por su flujo y por dos variables complementarias: un fondo blanco y un color monocromático. En la práctica es preferible proceder a la síntesis de colores añadiendo tres variables coloreadas: se trata de la síntesis tricrómica habitualmente utilizada en fotografía y en impresión. Pero en este caso conviene que las luces de colores tengan amplias bandas, es decir, no deben ser monocromáticas.

Todo color tiene su complementario, es decir, el color que por síntesis aditiva da blanco, amarillo y azul violeta, por ejemplo. Estos colores son espectrales, salvo el complementario del verde que es un púrpura, único color puro que no se encuentra en el espectro. Si se reparten los colores puros sobre un círculo las parejas de complementarios se hallan diametralmente opuestas. Las tríadas posibles en la síntesis tricrómica, en número de dos, se encuentran en los vértices de un triángulo equilátero.

En microscopia, desde el punto de vista de su

formación pueden distinguirse cinco categorías de colores:

los colores producidos por la absorción selectiva de un pigmento,
los colores producidos por la absorción-reflexión selectivas,
los colores producidos por interferencias de la luz natural,
los colores producidos por difusión dispersiva,
los colores producidos por interferencias de la luz polarizada.

El ojo es incapaz de diferenciar estas diversas modalidades de producción del color, de la misma manera que es incapaz de reconocer la composición de dos mezclas diferentes si éstas dan la misma impresión visual coloreada.

En **colorimetría** se ha adoptado internacionalmente un sistema denominado XYZ que traduce en el interior de un triángulo las coordenadas tricromáticas de todos los colores visibles. Los filtros de colores disponibles en el comercio se hallan distribuidos en el interior de dicho triángulo y representados por un punto y sus tres coordenadas. Las temperaturas de colores de las fuentes lumínicas están situadas sobre una parábola denominada lugar del cuerpo negro.

Cuando se interpone un filtro coloreado entre la lámpara y el ojo, se modifica la luz transmitida. Si este filtro es neutro, es decir, si absorbe indistintamente todas las longitudes de onda, las densidades ópticas se suman cuando superponemos filtros. Si los dos filtros superpuestos son complementarios se impide el paso de la luz; si se hacen combinaciones diversas se obtienen resultados variables, atendiendo a que el foco de luz tenga un espectro de bandas o bien sea continuo. En la práctica, una superposición gráfica de las curvas de los filtros con la curva de distribución espectral del foco lumínico permite prever el resultado. Cuando detalles del objeto son monocrómicos pueden asemejarse a un filtro. Si son policrómicos es deseable, para comprender lo que ocurre, descomponer previamente los factores tricromáticos, mediante una observación al espectrocalorímetro.

La mayoría de las **soluciones coloreadas** siguen la ley de Beer, es decir que su absorción es proporcional a la concentración y al grosor atravesado. En el caso de una mezcla de colorantes, los constituyentes generalmente siguen esta ley, en el caso de que no reaccionen entre ellos.

En el caso de la microscopia ocular, en oposición a la microscopia fotográfica, es lo que ocurre *globalmente* de la lámpara al ojo, después de haber atravesado el sistema óptico de iluminación uno o más filtros, sin olvidar que la luz atraviesa los medios intraoculares, que con la edad amarillean, lo que aumenta la subjetividad de la noción del color blanco de referencia.

Esto determina que en la práctica debamos siempre tener presente los **colores de referencia.** Son los «Códigos de colores» quienes proporcionan dicha información. Sólo uno de ellos permite comparar por transmisión, es la cromotaxia de M. Locquin, París, 1956, ed. del autor. El mismo autor elaboró en 1975 una «Guía de los colorantes naturales», seguida de una tabla de correspondencia de los colorantes de esta guía con los de las obras fundamentales de Saccardo, Ridgway y la notación en sistema Munsell. Esta última obra permite sólo la comparación con colorantes examinados por reflexión.

A las variables físicas: **longitud de onda dominante, pureza, luminosidad**, corresponden las variables psicológicas: **tonalidad, saturación, valor.** En la práctica son únicamente estos tres últimos los que cuentan y los que han servido de base al sistema más universalmente adoptado para definir los colores.

Si se quiere traducir en lenguaje corriente estos tres términos podrá decirse que la tonalidad está asociada al color puro dominante, la saturación a su grado de pureza, o inversa del % de blanco en el color, el valor del % de gris en el color.

Debe admitirse, sin embargo, que hasta la actualidad no hay ninguna teoría satisfactoria de la visión de los colores capaz de integrar todos los fenómenos conocidos. Esto nos dispensa de entrar en los detalles.

LA FORMACIÓN DE LAS IMÁGENES

En los tratados de óptica generalmente se empieza explicando el funcionamiento de la lupa, después sigue un aparato compuesto, representado por dos lentes simples, por ejemplo, la combinación objetivo-ocular del microscopio. Esta demostración poco convincente para el que no ha estudiado física, ha sido hecha en tantas ocasiones, que nos vemos dispensados de representarla.

Hay, por el contrario, un aparato extremadamente utilizado en la actualidad que nos parece mucho más similar al microscopio que la lupa, se trata de un simple proyector de diapositivas, o bien, la ampliadora de negativos fotográficos. En la figura 4 hemos representado horizontalmente la marcha de los rayos, en la parte superior figura el caso del proyector, abajo el del microscopio. Estas figuras son suficientemente explícitas como para no dar más explicaciones de esta cuestión. Los que deseen profundizar sobre la marcha de los rayos consultarán la figura 31; en el caso de un microscopio estereoscópico con dos objetivos (lupa binocular), la figura 20. Finalmente, para mayores precisiones consultar los tratados de óptica o los consagrados a la óptica y a la mecánica del microscopio.

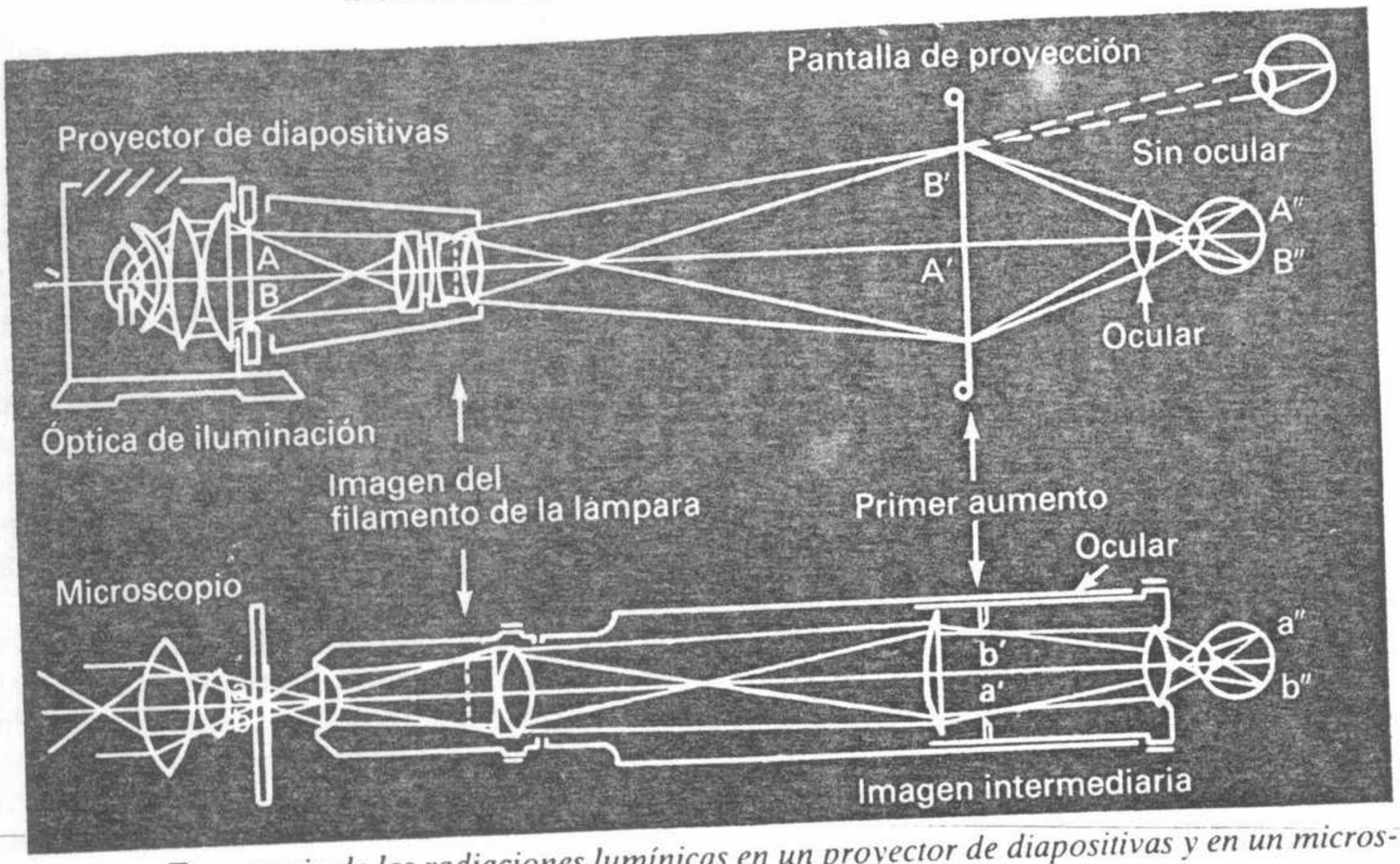


FIG. 4. — *Trayectoria de las radiaciones lumínicas en un proyector de diapositivas y en un microscopio.* Gráfico de Leitz-Wetzlar.

CONSIDERACIONES MECÁNICAS

Algunos parámetros mecánicos del microscopio han sido normalizados desde hace tiempo; la longitud del tubo portador de objetivos y oculares, el enfoque de los objetivos, el diámetro de los tubos oculares.

La longitud mecánica del tubo de los aparatos monoculares es habitualmente de 160 mm, pero es de 170 mm en los modelos de la casa Leitz y de 250 mm para la mayoría de los microscopios invertidos. Cuando se introduce un accesorio que cambia esta distancia, contada entre el objetivo y el ocular, debe haber un sistema óptico incorporado que corrija este cambio. Es el caso casi general de los tubos binoculares, tubos de dibujo, y de casi todos los accesorios intermediarios entre el estativo y el dispositivo de observación (figura 5).

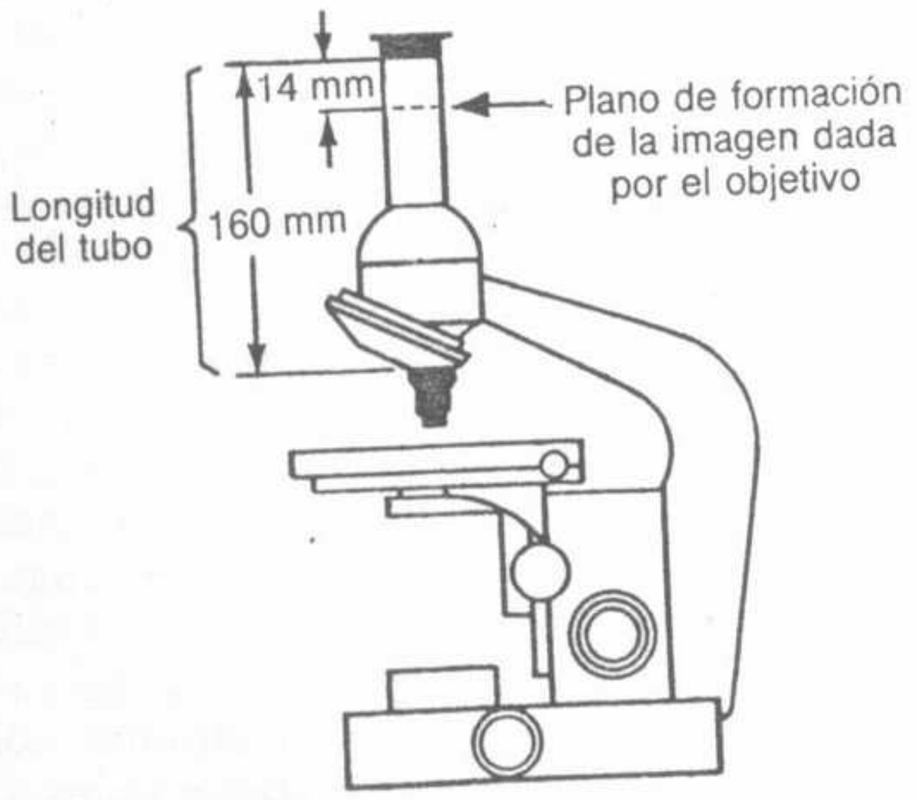


FIG. 5. — *Normalización mecánica del microscopio.* Gráfico de Wild-Heerbrugg.

La estandarización de los objetivos se ha hecho alrededor de las normas establecidas en Inglaterra por la Royal Microscopical Society, sobre todo en lo que respecta al acoplamiento del portarrevólver. Incluso, la longitud del objetivo puede variar de un constructor a otro, siendo el valor medio de 35 mm.

Cuando el constructor equipa su microscopio con objetivos corregidos para producir una imagen al infinito, una lente conduce esta imagen a una determinada distancia de observación y pueden colocarse todo tipo de dispositivos intermediarios antes de esta lente. Se trata sin duda de la mejor solución. Permite la introducción de un vehículo óptico especialmente concebido para ajustar el plano focal del objetivo y permite varias operaciones: introducción de placas de fases y de compensadores diversos.

LAS ABERRACIONES

Se denominan aberraciones a los defectos de corrección del sistema óptico. En microscopia tres aberraciones tienen verdadera importancia:

La **aberración esférica**, que no debe confundirse con la curvatura de campo. La aberración esférica es debida al efecto del prisma de una lente simple que provoca a partir de un foco lumínico puntual la formación no de una imagen puntual, sino de una capa cáustica de rayos. Se la corrige pegando dos o tres lentes de diferente índice de refracción y de distinta dispersión (fig. 6).

La **aberración cromática**, debida a la diferencia de longitud focal y en función de la longitud de onda. Se corrige de la misma manera (fig. 7).

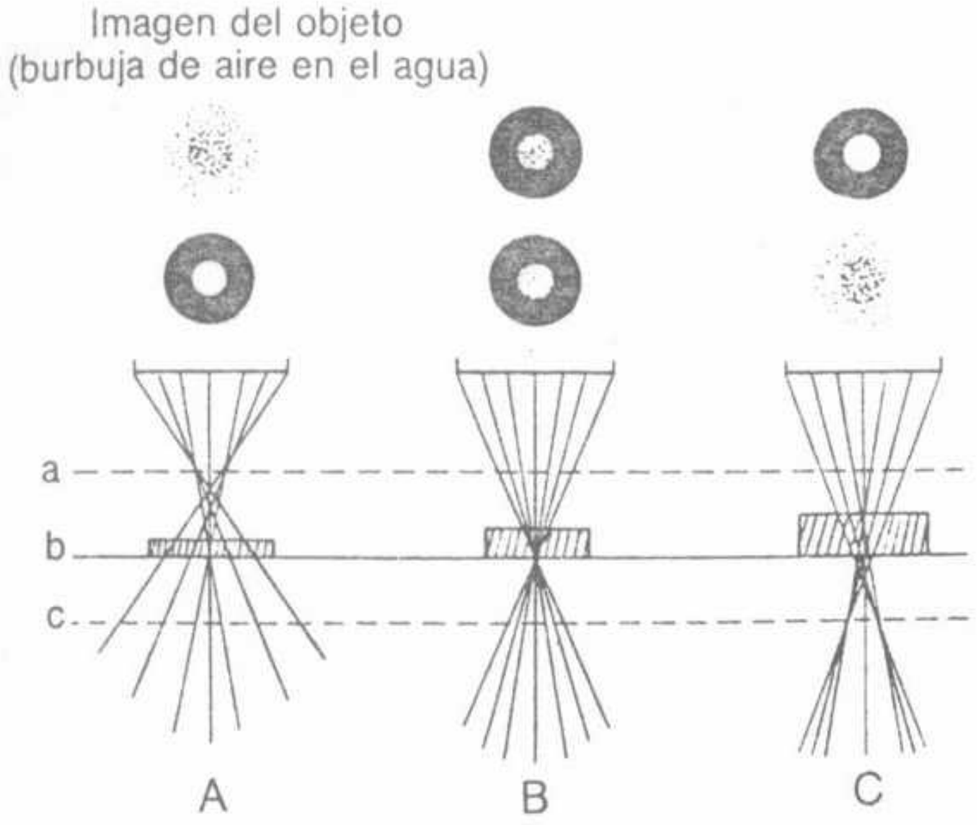


FIG. 6. — *Verificación de la corrección de la aberración esférica de un microscopio.* Arriba, dos imágenes desenfocadas, sobreenfocadas y subenfocadas, de una gota de aire en el agua, con tres grosores de cubreobjetos. El cubreobjetos A es demasiado delgado, el cubreobjetos B es correcto y el cubreobjetos C es demasiado grueso.

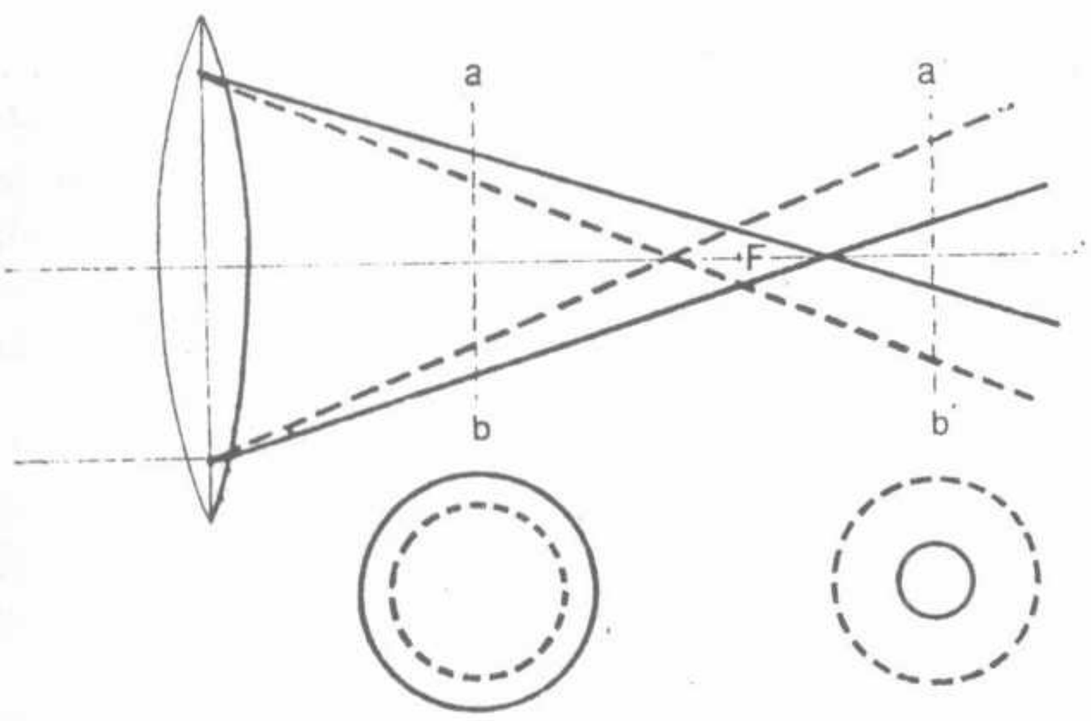


FIG. 7. — *Aberración cromática de una lente simple.* Trayectoria de la luz roja en línea continua, de la azul en línea discontinua. Desenfocando a ambas partes del foco F, se obtiene una imagen azul a la derecha y roja a la izquierda.

La **curvatura de campo** debida al hecho de que a partir de un objeto plano un objetivo da generalmente una imagen en forma de casquete esférico. Simultáneamente no pueden enfocarse el centro y los bordes de la imagen. Este defecto es más acusado y molesto cuanto más grande es el campo de observación. Se aprecia más en fotografía microscópica que cuando se observa directamente a través del ocular, dado que las posibilidades de focalización del ojo junto con las variaciones permanentes que tienen lugar durante la observación, al accionar el tornillo micrométrico, dan una síntesis permanente de varios planos del objeto.

Una cuarta aberración menos aparente es **la coma** debida a los defectos de centraje de los diversos constituyentes del objetivo. Se aprecia sobre todo cuando se observan pequeños detalles en campo oscuro, si el centrado no es perfectamente simétrico, la imagen de un punto luminoso sobre fondo oscuro presenta una cola lateral de cometa.

LA PROFUNDIDAD DE CAMPO

Se denomina profundidad de campo a la distancia que separa, siguiendo el eje óptico, las partes extremas del objeto, nítidas, sin variación mecánica del enfoque. Durante la observación ocular el operador compensa una escasa profundidad de campo haciendo accionar el tornillo micrométrico y enfocando los diversos planos de observación. Con la fotografía no ocurre lo mismo, salvo en el caso de que se recurra a la técnica de las sobreimpresiones sucesivas descritas en la pág. 9.

Para aumentar la profundidad de campo se escogerá siempre el objetivo de menor aumento compatible con el poder de resolución deseado y el aumento ocular más elevado. En la fotografía se tendrá el recurso de obtener mayor poder amplificante al positivar, a pesar de haber obtenido la imagen con el objetivo y ocular de menor aumento.

LA ESFERICIDAD DE CAMPO

Un campo es plano cuando la imagen de un frotis es totalmente nítida. Es la combinación objetivo-ocular la que da este resultado. El cambio de uno de ellos resulta, así, desaconsejable.

LA IMAGEN MICROSCÓPICA EN ÓPTICA ONDULATORIA

Hasta el momento, en lo que ha precedido, hemos hablado del aspecto geométrico de la marcha de los rayos lumínicos en el microscopio. Este aspecto es suficiente para explicar la formación de la imagen a pequeños aumentos, pero a grandes aumentos, la difracción producida por las estructuras es más importante y debe considerarse. Es a Abbe, auténtico fundador de la óptica moderna del microscopio, a quien debemos haber establecido esta necesidad. Basta con tener un micrómetro objetivo para poder llevar a cabo el sencillo experimento que a continuación detallamos. Este micrómetro objetivo está formado por una malla de trazos negros sobre fondo blanco. Observemos el extremo, en que los trazos están más próximos entre sí, con una combinación de gran aumento y tras tenerlo bien enfoca-

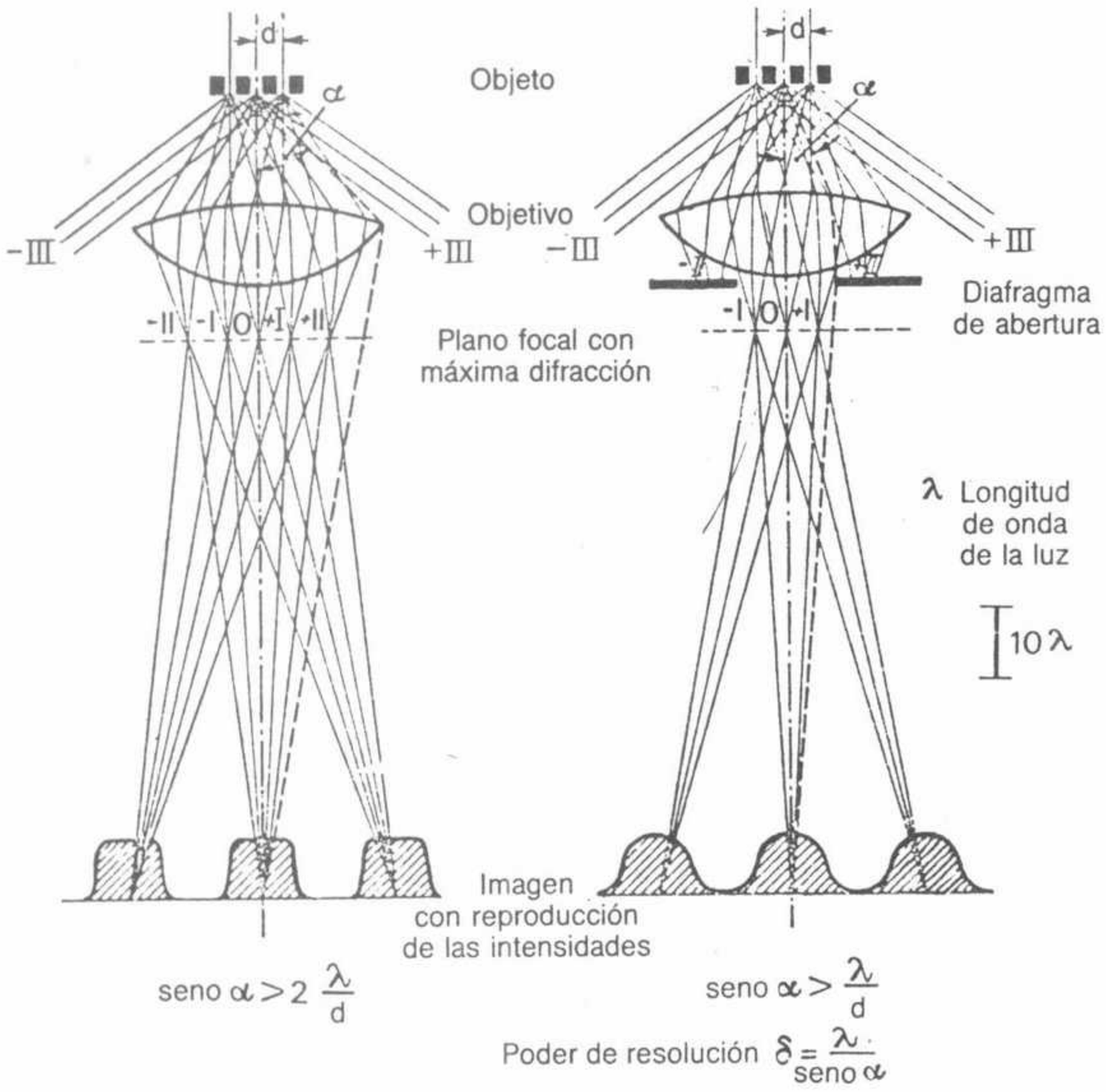


FIG. 8. — *Influencia de la abertura numérica de un objetivo sobre el poder de resolución y la definición de la imagen.* A la derecha son recogidos dos máximos secundarios, a la izquierda cinco.

do, quitemos el ocular para observar el plano focal del objetivo posterior con una lente intercambiable, del tipo de las utilizadas para el centrado de las placas de fases. Diafragmemos con el diafragma de abertura del condensador al máximo. En el plano focal se observa una sucesión de manchas de bordes coloreados por un lado y por otro la mancha blanca central. A esta mancha se le da el nombre de máximo 0 y, las manchas coloreadas, máxima de orden 1, después 2, después 3, etc., a medida que nos alejamos del eje. Sacando el objeto debe verificarse que únicamente persiste el orden 0. Enfocando el micrómetro objetivo, disminuimos los aumentos cambiando el objetivo. Con un objetivo suficientemente débil se constata que únicamente hay el máximo de orden 0 y volviendo a colocar el ocular el objeto queda totalmente invisible, sea cual fuere el aumento del ocular utilizado. Basta con colocar un objetivo de abertura numérica suficiente para admitir al menos los dos máxima de difracción del orden 1 para que una imagen del objeto aparezca. Las figuras 8 y 9 ilustran lo que ocurre en el objetivo del microscopio.

En óptica se demuestra que si α es el mayor ángulo que pueda formar un rayo con el eje óptico, para poder todavía entrar en la abertura numérica del objetivo, la menor distancia visible

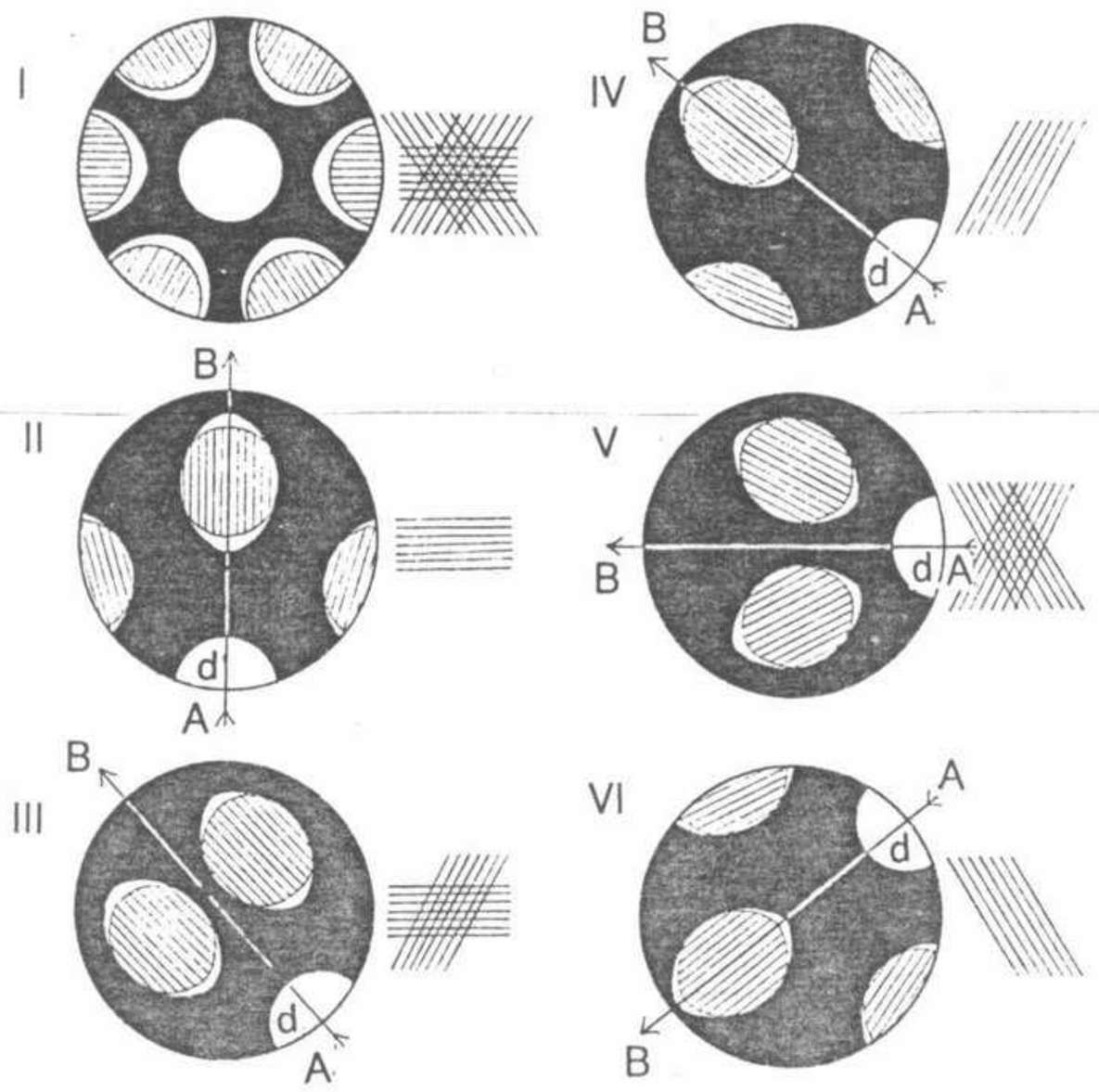


FIG. 9. — *En el círculo imagen conoscópica, al lado de la imagen ortoscópica esquemática de la diatomea test: Pleurosigma angulatum.* I, iluminación central, de II a VI iluminación oblicua. Puede apreciarse cómo la imagen completa está constituida por imágenes orientadas pero incompletas, pudiendo dar imágenes de estructuras falsas. Según Langeron.

que pueda observarse separadamente por el objetivo está determinada por la relación:

$$d_n = \frac{0{,}5\ \lambda}{n \text{ sen } \alpha}$$

siendo λ la longitud de onda de la luz utilizada y sen α la abertura numérica del objetivo a seco utilizado, siendo n el índice del medio de inmersión utilizado en la observación con los objetivos de inmersión (n = 1 por definición para los objetivos en seco) (fig. 10).

En la práctica es raro que se pueda trabajar con el diafragma de abertura totalmente abierto;

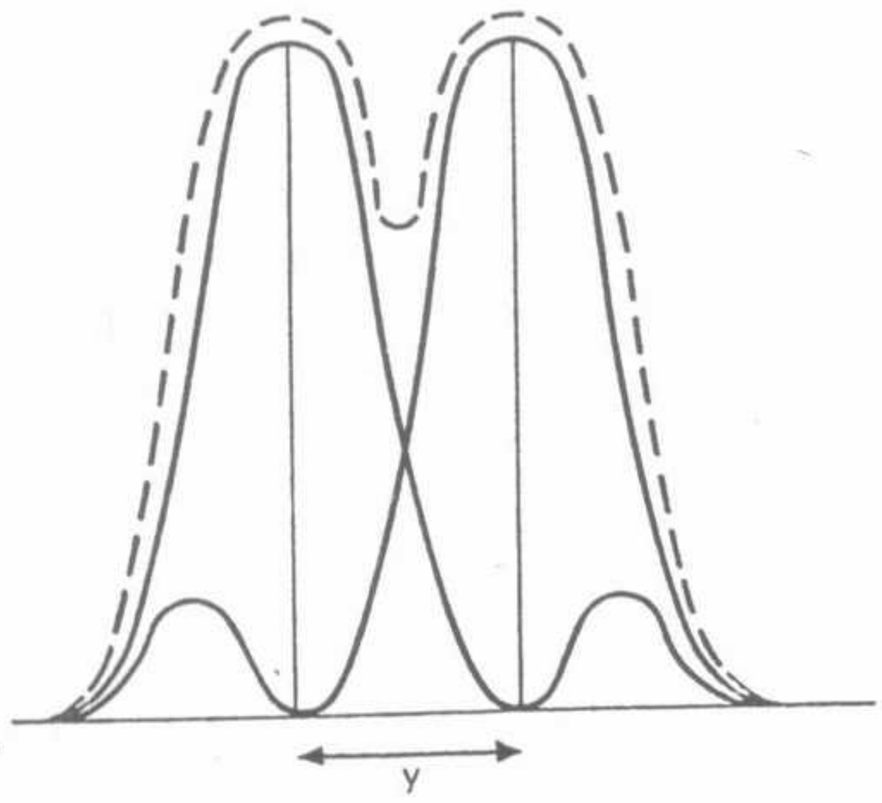


FIG. 10. — *Límite de resolución según Raleigh*. Corresponde a la imagen del rayo del disco de *Airy*, es decir: d_n.

cuando se trabaja con el objetivo de inmersión debe también hacerse la inmersión con el condensador. La fórmula debe tener presente este límite, sustituyendo n sen α por:

$$\frac{n \text{ sen } \alpha_{objetivo} + \text{sen } \alpha_{condensador}}{2}$$

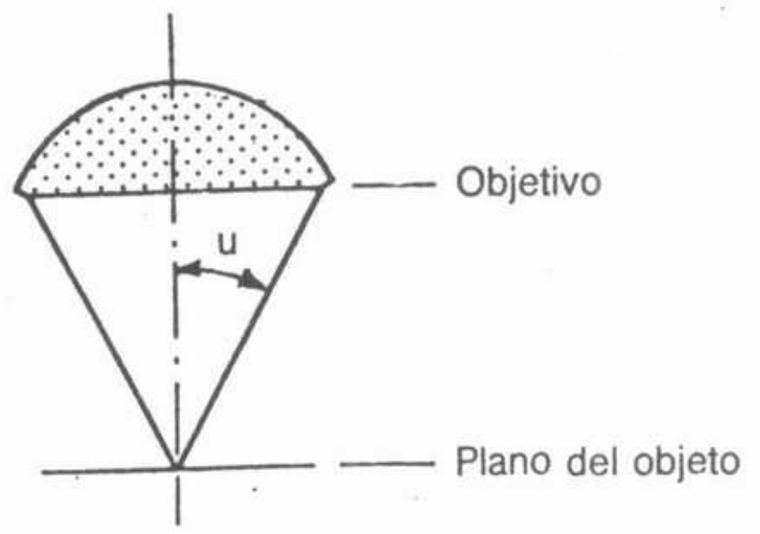


FIG. 11. — *Abertura numérica de un objetivo*. 2n sen α; siendo α el semiángulo de abertura. Si el objetivo funciona en el aire $n = 1$; n sobrepasa 1,5 con un objetivo de inmersión.

EL AUMENTO ÚTIL

Acabamos de ver cómo se requiere una determinada abertura numérica n sen α para que un objetivo permita ver dos puntos separadamente y suficiente para admitir al menos un máximo de difracción del orden 1. Pero para que dos puntos se observen como tales el ojo debe separarlos.

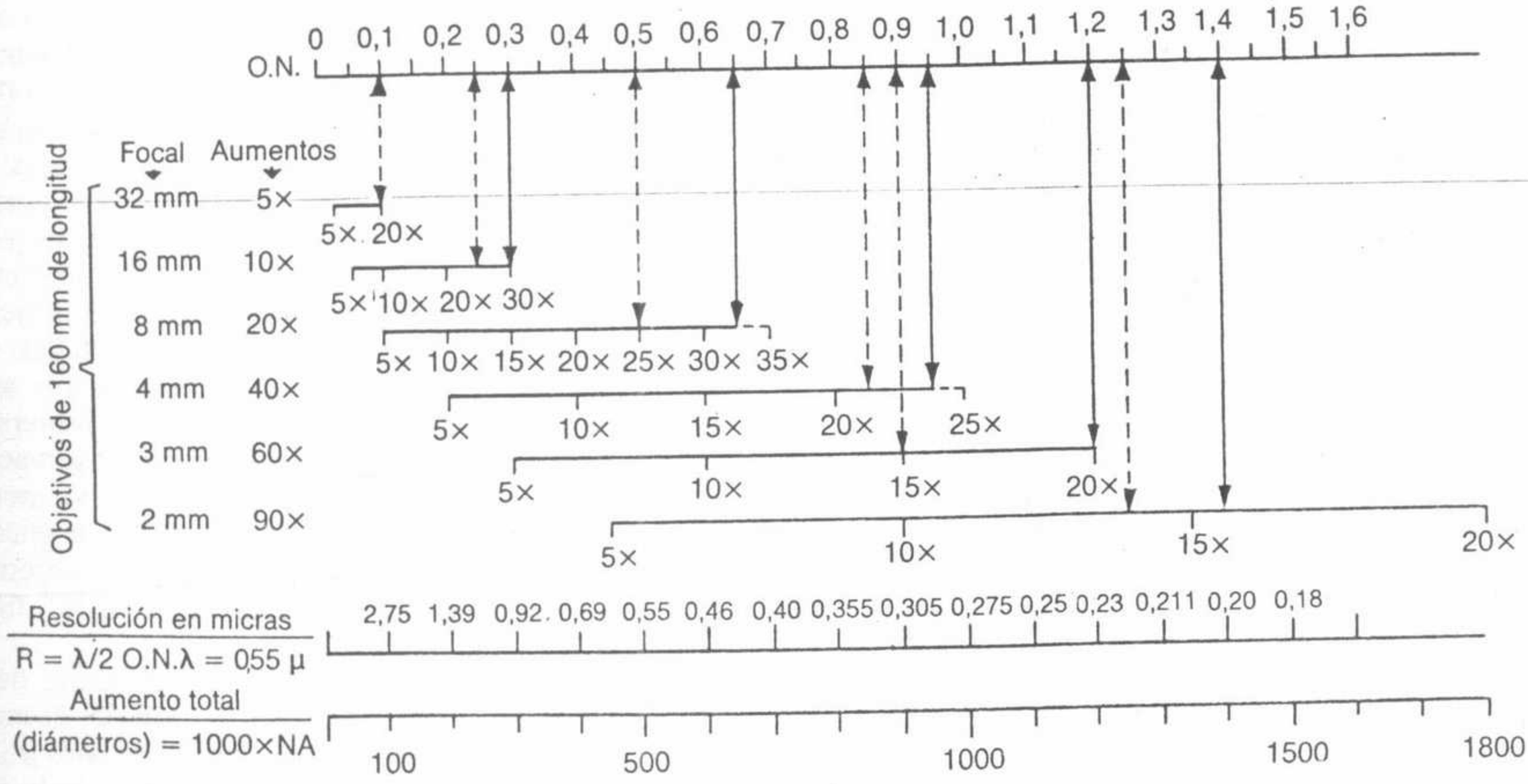


FIG. 12. — *Combinaciones utilizables entre los oculares* (horizontalmente) *y los objetivos* (verticalmente). Las flechas verticales unen las combinaciones óptimas para la longitud convencional del tubo de 160 mm. Las flechas en línea de trazo indican los sistemas acromáticos, en trazo continuo indican los apocromáticos. Prolongando estas líneas verticales hacia abajo se obtiene la resolución en micras y el aumento total empleado.

Sabemos que el poder separador angular del ojo es de 2', lo que corresponde a 0,15 mm observados a una distancia de 250 mm. Es por ello que el ocular debe aumentar la imagen dada por el objetivo de tal manera que dos detalles del objeto aparezcan al menos separados por este valor. La práctica demuestra que cuando los objetos son de contraste medio debe aumentarse unas 800 veces la abertura numérica del objetivo utilizado. En todo caso no debe nunca hacer bajar la abertura numérica por debajo de 500 veces, de lo contrario se perdería gran número de detalles; es aconsejable adoptar el factor 1000 (figs. 12 y 13).

En la fotografía ya no es el ojo quien registra los detalles, sino una emulsión en la que hay que considerar la presencia de los granos de plata de la emulsión y una cierta difusión de la luz en el seno de la capa sensible. En la práctica puede admitirse un círculo de difusión del orden de 1/60 mm. Esto nos conduce a producir sobre la película un aumento igual a 80 veces la abertura numérica con una posibilidad de aumento del orden de 10 para encontrar sobre la imagen del papel el mismo poder de solución que en la imagen aérica ocular. Dado que no siempre resulta cómodo trabajar en los límites sin que haya fatiga ocular, aconsejamos al operador trabajar a aumentos del orden de las 1600 a 1800 veces superiores a la abertura numérica. Cuando los aumentos deben ser observados en conjunto desde más lejos se podrá llegar a aumentar hasta 3600 veces la abertura numérica (figs. 12 y 13).

Cuanto más elevados son los aumentos del ocular más molestos son los defectos internos del ojo, sobre todo con la edad. Para ello se han propuesto varias soluciones, una de las más sencillas es la observación de una imagen proyectada sobre una pantalla sin grano, por reflexión o sobre una lente con escalones de Fresnel para transmisión, procurando hacer coincidir la posición del ojo con su foco.

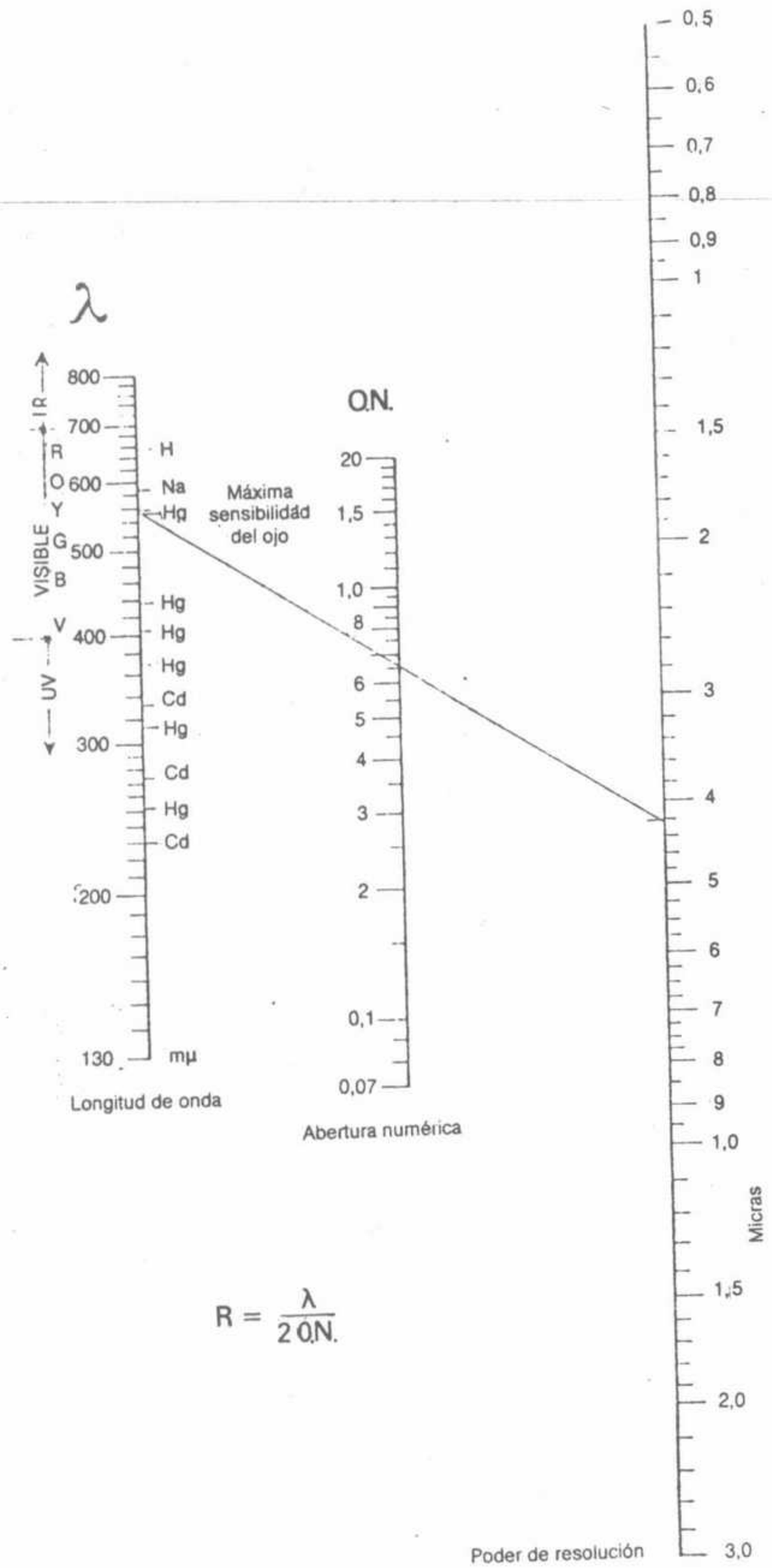


FIG. 13. — *Nomograma que permite la determinación del poder de resolución de los objetivos*. Por encima de 1,0 μ figuran las decenas de micrómetro.

LA INMERSIÓN HOMOGÉNEA DE LOS OBJETIVOS

La abertura numérica teórica máxima de los objetivos que funcionan al aire es de 1,0. El límite práctico es de 0,95, pero pocos objetivos la tienen. Fue Amici quien tuvo la idea de construir objetivos cuya lente frontal pudiera sumergirse en una gota de aceite de índice de refracción igual o superior al del vidrio que la constituye. Esto representa una serie de ventajas: anula todas las reflexiones parásitas sobre el portaobjetos y sobre la cara de entrada del objetivo, y sobre todo aumenta la abertura numérica hasta 1,40. Para superar estos valores se han hecho inmersiones utilizando líquidos de índice mucho más elevados, pero ello determina una serie de complicaciones. Los objetivos de inmersión en agua fueron diseñados para la observación de objetos acuáticos directamente, en su medio natural. En el ultravioleta se utiliza la glicerina o el azúcar de caña para trabajar con objetivos especialmente construidos con esta finalidad (figura 14).

Desde hace mucho tiempo el aceite de cedro (que no debe confundirse con la esencia del mismo nombre) ha sido uno de los más utilizados en microscopia. Actualmente se tiene la tendencia de sustituirlo por aceites sintéticos menos viscosos y que no se endurecen con el tiempo, y por lo tanto evitan enojosos contratiempos que ocu-

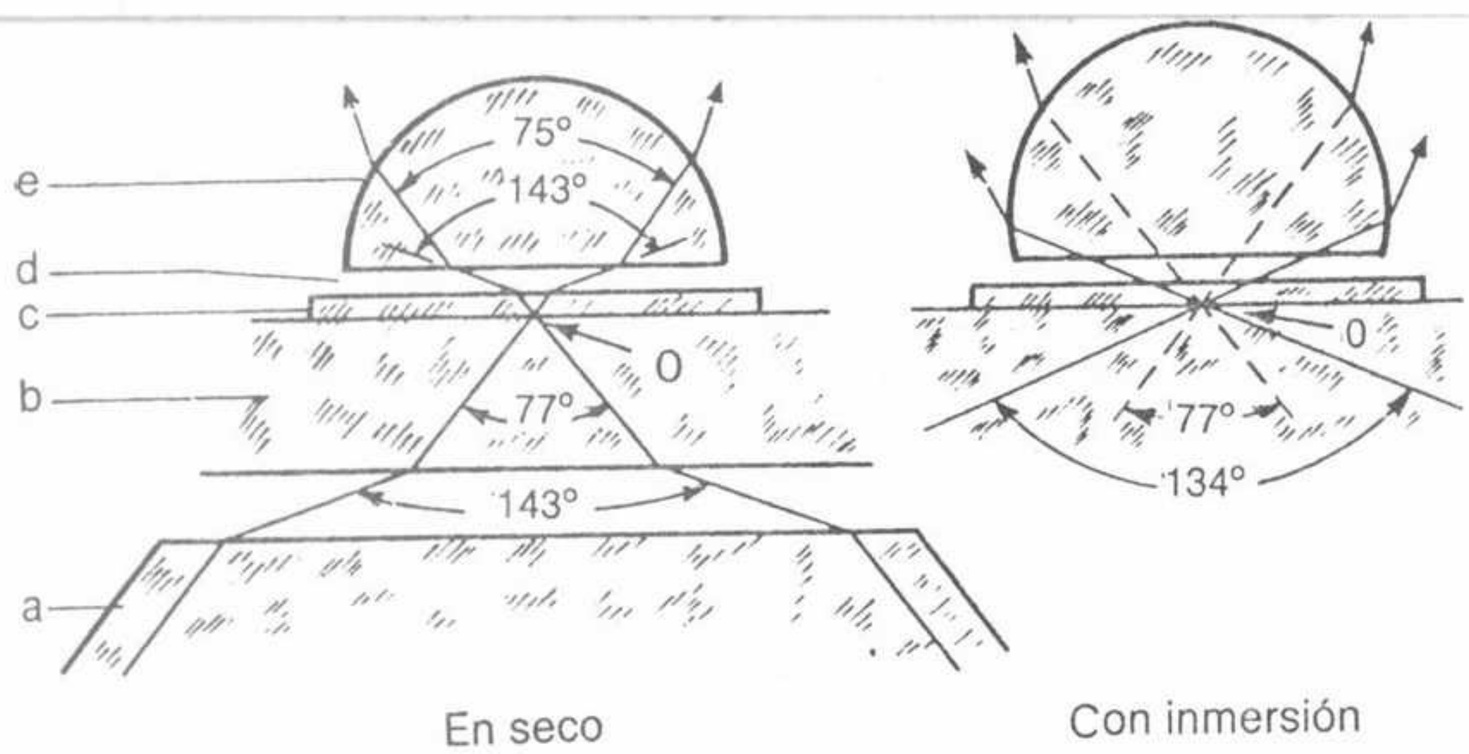


FIG. 14. — *Trayectoria de los rayos en un objetivo a seco a la izquierda y de inmersión a la derecha.* a, lente frontal del condensador; b, portaobjetos; o, objeto; c, cubreobjeto; d, intervalo de aire o de aceite; e, lente frontal del objetivo.

rren a veces cuando se seca el aceite de cedro a nivel de la lente frontal. Se recomienda sacar la lente frontal después de cada observación, ¡nunca debe usarse gamuza!, debe hacerse con papel especial para la limpieza de gafas o con un trozo de hilo usado, no debe usarse ningún disolvente, ya que a la larga podrían llegar a despegarse las lentes.

El índice del aceite de inmersión se ha fijado convencionalmente en 1,515. Si nos alejamos demasiado de este valor, el detalle que obtenemos de la imagen no es tan nítido; éste es el caso que se da en ocasiones cuando se trabaja en condiciones de temperaturas extremas.

En caso de no disponer de aceite de cedro puede utilizarse el aceite de ricino n = 1,478, la esencia de girasol n = 1,533 o glicerina saturada de cloruro de cadmio n = 1,514, pero únicamente se trata de una solución de compromiso.

LOS TRATAMIENTOS ANTIRREFLEJANTES DE LAS SUPERFICIES ÓPTICAS

Cuando un haz luminoso incide sobre una superficie de vidrio una gran parte es refractada y atraviesa este vidrio, una pequeña parte, de un 6 al 8 % se refleja y da lugar a una «luz parásita» molesta, que disminuye los contrastes en la imagen e incluso llega a producir una mancha clara en su centro. Dado que frecuentemente el sistema óptico de un microscopio conlleva unas 20 interfases aire-vidrio, situadas entre el objeto y el ojo del observador, la cantidad de luz perdida es muy considerable. Colocando en la superficie del vidrio una capa transparente de espesor fijo y teniendo un índice de refracción inferior al del vidrio, es posible atenuar considerablemente los reflejos si el grosor de la capa es de $\lambda/4$ con relación a la longitud de onda de la luz incidente, dado que en este caso, en la reflexión, se obtiene un desfase de $\lambda/2$, es decir una extinción. De lo dicho anteriormente se deduce inmediatamente que la extinción total sólo es posible para una sola longitud de onda. Se centra en general alrededor de 0,55 micrómetros y el reflejo residual de tonalidad adquiere una tonalidad púrpura. Tratamientos con capas múltiples permiten una extinción casi total de los reflejos en todos los niveles del espectro.

Sobre todo son utilizados por los sistemas ópticos de observación por reflexión con iluminación incidente a través del sistema de observación y en polarización.

II. — INSTRUMENTOS BÁSICOS

A. — *LA PARTE MECÁNICA DEL MICROSCOPIO*

Desde el punto de vista del usuario y no del constructor, la mecánica debe presentar tres características importantes: estabilidad, fiabilidad y comodidad.

El microscopio es una especie de «brazo de palanca óptica» que por sus aumentos no sólo amplifica el objeto observado, sino también todos los defectos de estabilidad del estativo; no es po-

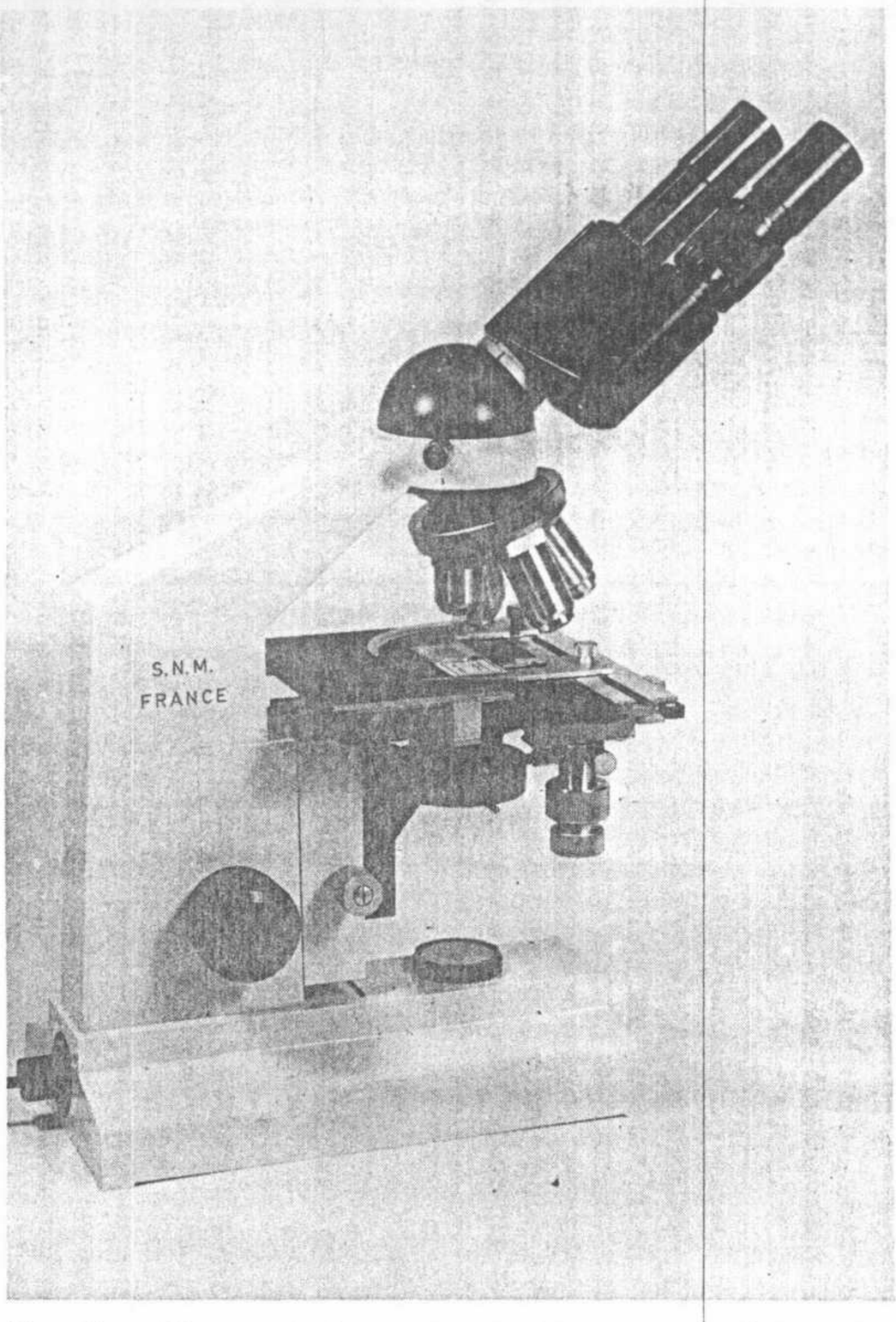


FIG. 15. — *Microscopio de investigación Stiassnie, con tubo binocular inclinado, platina con carro móvil, con mandos coaxiales verticales y sistema de iluminación incorporado.* Documento de S. N. M. Paris.

FIG. 16. — *Microscopio portátil Wild con su estuche metálico de protección.* Documento Wild-Heerbrugg.

sible obtener buenas imágenes si éstas no son mecánicamente estables. Esta estabilidad depende en gran parte de la forma del estativo, de su diseño, pero también de su instalación, siendo esto frecuentemente olvidado. Los grandes estativos modernos de investigación se orientan hacia una concepción «en puente» o modular, que garantiza una estabilidad completa. Para comprobar en la práctica esta estabilidad deben observarse los siguientes detalles:

— *estabilidad de los movimientos,* el microscopio equipado con todos sus accesorios; la deriva puede ser lenta, será altamente molesta para las tomas de imágenes en cinemicrografía;

— *estabilidad del tubo de observación,* que no debe deslizarse lo más mínimo cuando se apoya el ojo del observador al ocular;

— *estabilidad de la platina,* que no debe oscilar cuando se hace desplazar en cualquier sentido o cuando se desplaza manualmente la preparación;

— *estabilidad térmica* cuando se efectúan tomas de imágenes cinematográficas de larga duración; el enfoque no debe ser afectado por las posibles variaciones de temperatura durante la filmación.

Esta estabilidad conduce a una determinada fiabilidad, aunque ésta dependa también de otros factores, aparte de los mencionados, como son: la estabilidad de la iluminación, la de las células fotoeléctricas, la parafocalidad al cambiar el objetivo.

En cuanto a la comodidad de empleo debe señalarse que se consigue con el diseño de mandos coaxiales, situándolos en la base del estativo, de manera que las manos descansen sobre la mesa. Lamentamos que la práctica de construir apoyacabezas empotrados a la pared no se haya generalizado. Es, sin embargo, el único sistema para mitigar el cansancio de las vértebras cervicales en las observaciones prolongadas. La mayoría de los microscopios no tienen los tubos binoculares suficientemente inclinados hacia la horizontal. La posición ideal sería con relación a la horizontal de unos 15° y no de 45°, o incluso de 60°.

LOS MICROSCOPIOS INVERTIDOS (= Invertoscopios)

El diseño del microscopio invertido se debe a Le Chatelier, siendo el más utilizado en metaloscopia. Aunque inicialmente se pensó para microquímica, pronto se reveló como muy interesante en otros campos: observación de cultivos celulares o bacterianos en cápsula o en frascos de fondo plano, microdisección y micromanipulación, observación de líquidos corrosivos, observación de fitoparásitos, estudio de aglutinizaciones serológicas, reacciones de complemento, microprecipitados, depresión del punto de fusión a elevada temperatura, observación de objetos gruesos a través de una cámara de observación bajo el vacío, a baja temperatura, a alta temperatura, en una cámara estéril, en una caja para sustancias radiactivas, en medio líquido espeso, etc.

En el caso de los cultivos, la observación se hace a través del medio de cultivo, por lo que éste debe ser lo menos espeso posible; en el caso de que el medio sea líquido será imprescindible un destello electrónico, dado que las vibraciones mecánicas son demasiado perturbadoras.

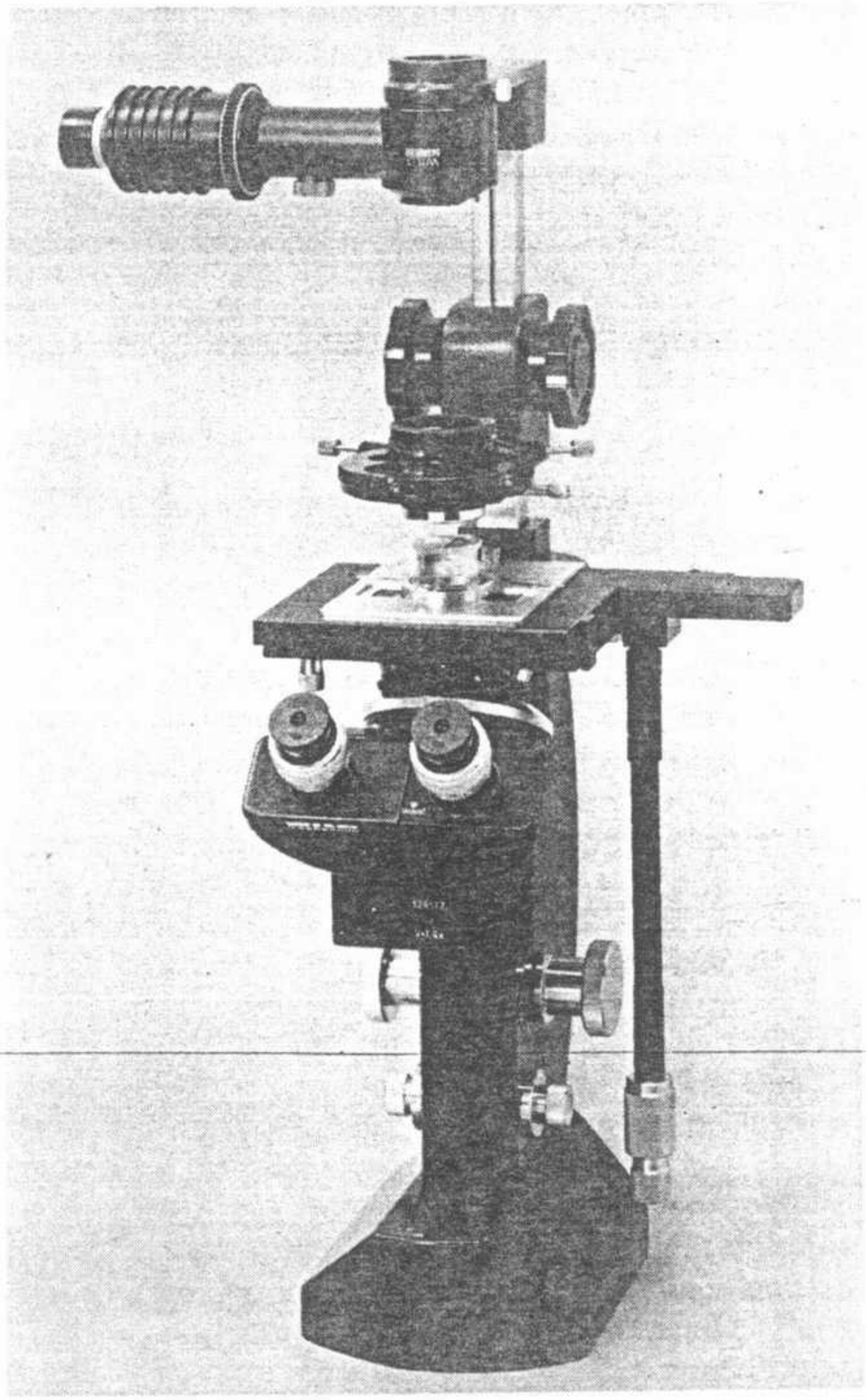


FIG. 17. — *Microscopio invertido Wild.* Documento Wild-Heerbrugg.

ESTEREOMICROSCOPIOS Y MICROESTEREOPROYECTORES

Los «estereomicroscopios», mal denominados «lupas binoculares», son microscopios dobles, con dos objetivos y dos oculares, en los que hay montado un doble prisma, que generalmente de-

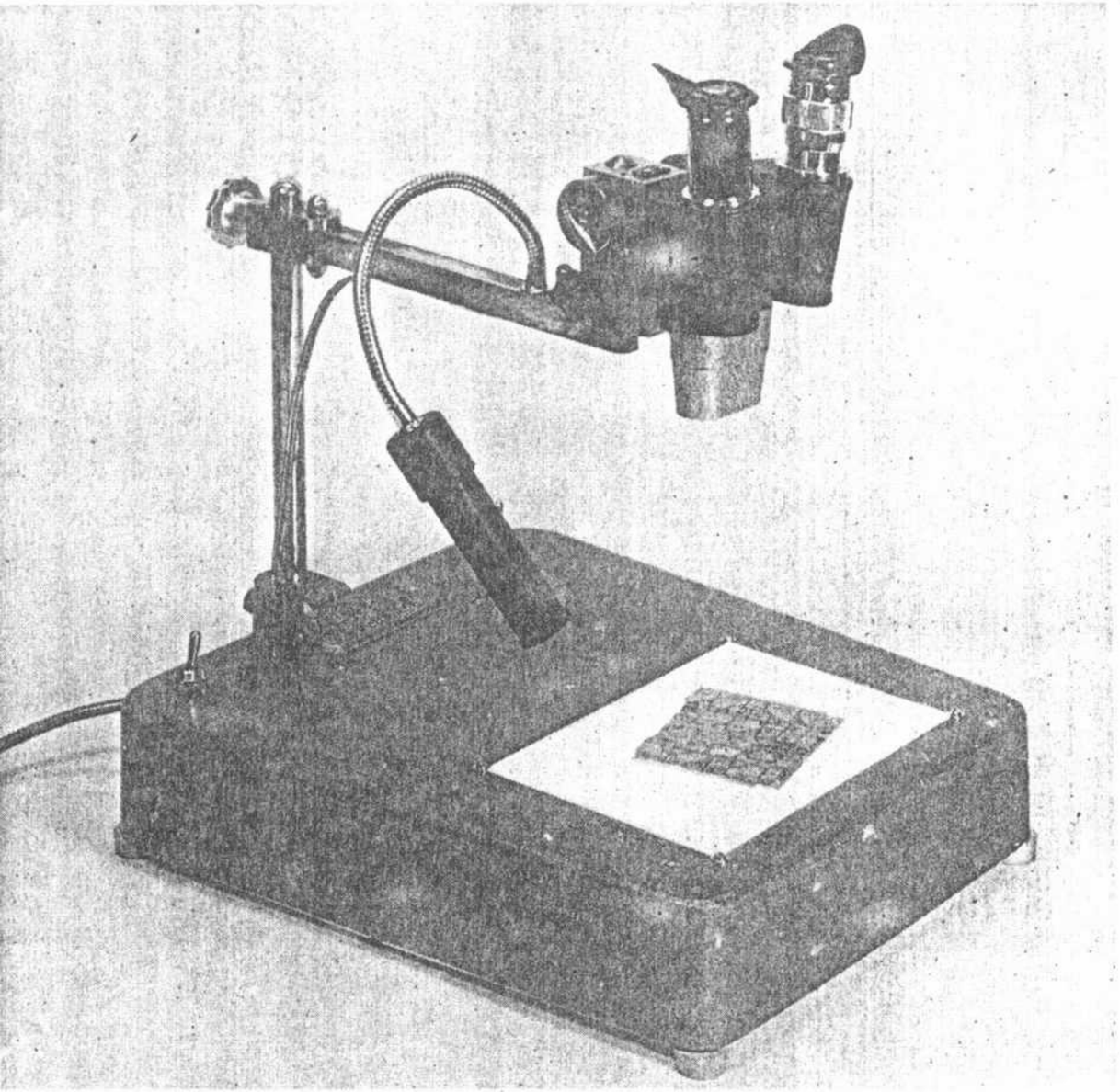


FIG. 18. — *Estereomicroscopio simple LBB de Gruber con base lumínica.* Documento Gruber.

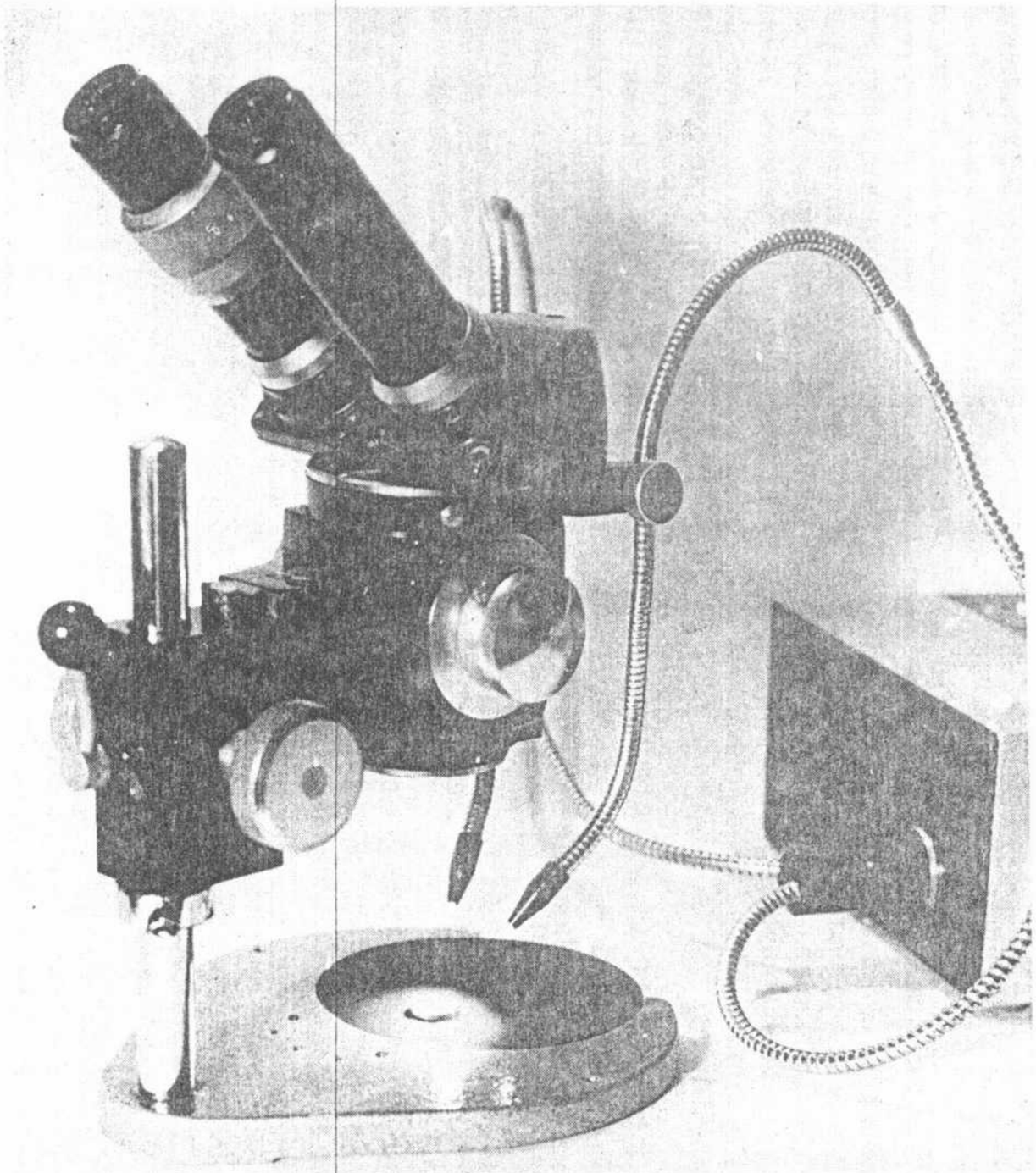


FIG. 19. — *Estereomicroscopio con cambiador de aumentos Stéréovar A de BBT, con dispositivo de iluminación a base de fibras ópticas flexibles.* Este dispositivo de iluminación da una luz fría y ofrece gran facilidad de orientación. Documento BBT, Paris.

termina un retraso, para enderezar las imágenes y conservar el relieve. Su construcción mecánica debe ser todavía más cuidadosa que la de los microscopios monoobjetivos, lo que explica su precio más elevado. La iluminación del objeto se hace, bien sea por transparencia o más frecuentemente por incidencia. Diversos accesorios se disponen para completar la dotación de los estereomicroscopios de investigación: equipo microfotográfico, doble dispositivo de observación para poder trabajar dos observadores simultáneamente, cámaras claras, microdisectores, etc.

El «microestereoproyector» permite un cómodo examen estereoscópico para uno o varios observadores. En este aparato diseñado por VEB C. Zeiss, Jena, las dos imágenes que salen de los dos objetivos son proyectadas sobre un vidrio deslustrado acoplado a una lente de Fresnel que recibe la imagen aumentada y difusa de las dos pupilas de salida del sistema óptico. La posición de los ojos del observador no es tan crítica y la observación es sumamente cómoda. El hecho de que la imagen pueda ser observada por varios observadores a la vez permite la demostración y el comentario.

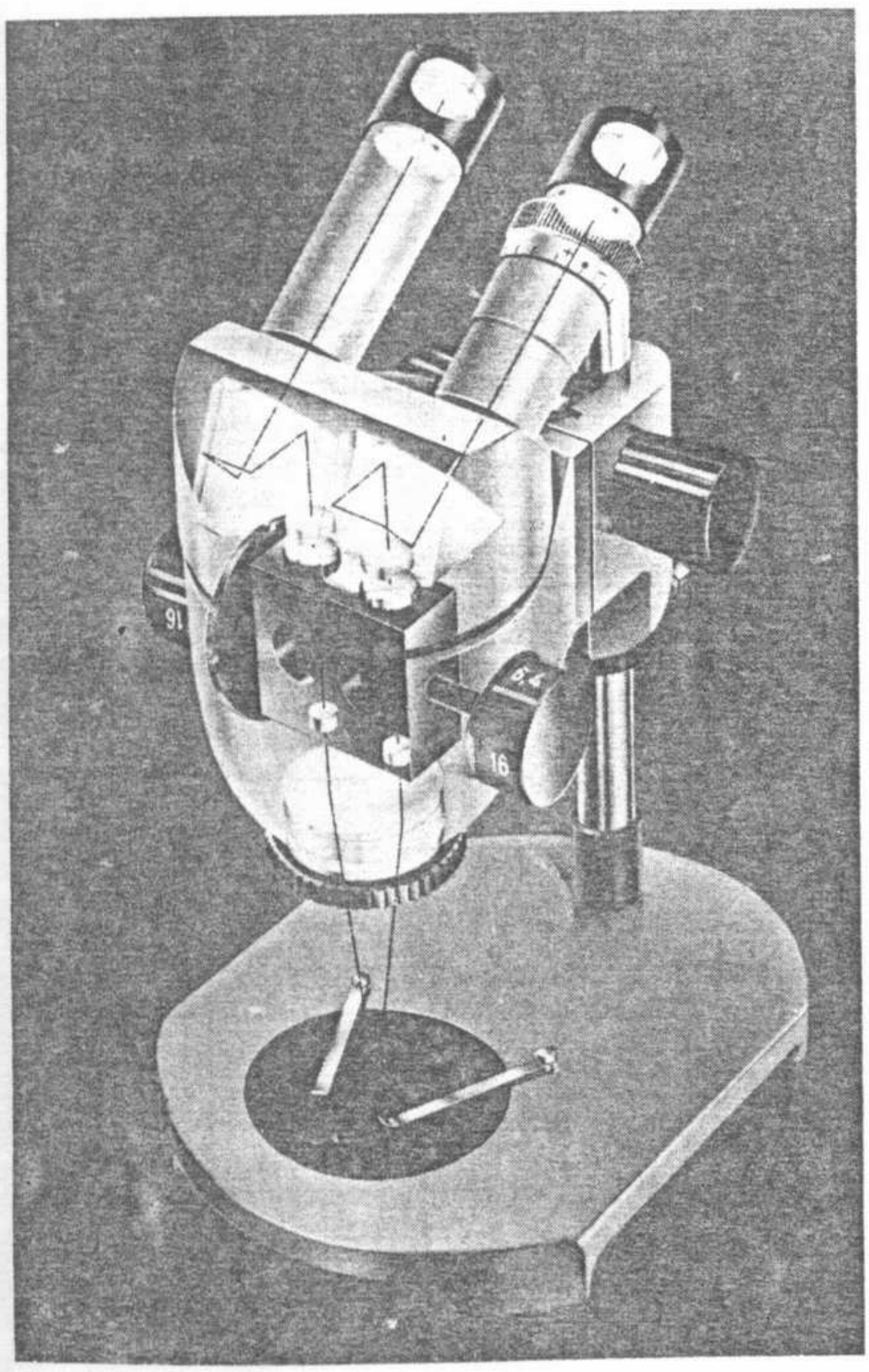


FIG. 20. — *Estereomicroscopio con cambiador de aumentos Wild.* Imagen de una sección en perspectiva de la marcha de los rayos. Documento Wild-Heerbrugg.

Los aparatos que sirven para hacer microdisecciones son micromanipuladores simplificados que permiten hacer sencillas operaciones a débiles aumentos (cf. p. 85).

Esterilización. — Los estereomicroscopios son frecuentemente utilizados sobre un campo operatorio, en oftalmología, por ejemplo. El aparato debe ser esterilizado previamente. Para ello no puede utilizarse el calor, ya que desprendería las lentes, ni los ultravioleta, que no penetrarían en las partes más recónditas de la mecánica ni en los tubos. El mejor método ha sido indicado por F. Bockmühl y R. Kossek. El conjunto del aparato se dispone en un saco de plástico en el que se introducen unas 18 horas antes de su utilización cinco gramos de paraformaldehído. Los vapores de formol desprendidos penetran por todos los rincones del aparato, esterilizándolo. Antes de su empleo, se retira la bolsa de plástico y se secan los oculares con un tapón estéril. El operador con guantes estériles puede tocar todas las piezas sin miedo de contaminación.

PRINCIPALES FUENTES DE LUZ

Luz diurna. — En la actualidad casi no se utiliza dado que presenta grandes variaciones de intensidad y sobre todo grandes variaciones de su temperatura de color. Sin embargo, algunos autores la encuentran insustituible para observar la reacción amiloide del yodo.

Lámparas de gas. — En los sitios donde no hay electricidad puede utilizarse una lámpara de gas con un manguito Auer; el brillo es suficiente para las observaciones en fondo claro, pero la tonalidad verdosa de la luz altera el reflejo de los colores.

Lámparas incandescentes. — El calentamiento por efecto Joule de un filamento de tungsteno es todavía la fuente lumínica más utilizada. Para que la iluminación sea eficaz el filamento debe ser cuanto más compactado mejor. Para ello se utiliza un voltaje bajo: de 6 a 12 V y un bobinaje en espirales aplanadas o en cortina. Cuando la lámpara posea un espejo regulable, éste no debe reflejar el filamento sino a su lado para doblar la superficie útil. La variante cuarzo-yodo o cuarzo-halógeno tiene una lámpara de cuarzo de pequeñas dimensiones dado que la presencia del yodo y del bromo junto con el criptón en la atmófera de la lámpara evita la evaporación del filamento de tungsteno, que de esta manera puede funcionar a temperaturas mucho más elevadas. La tempera-

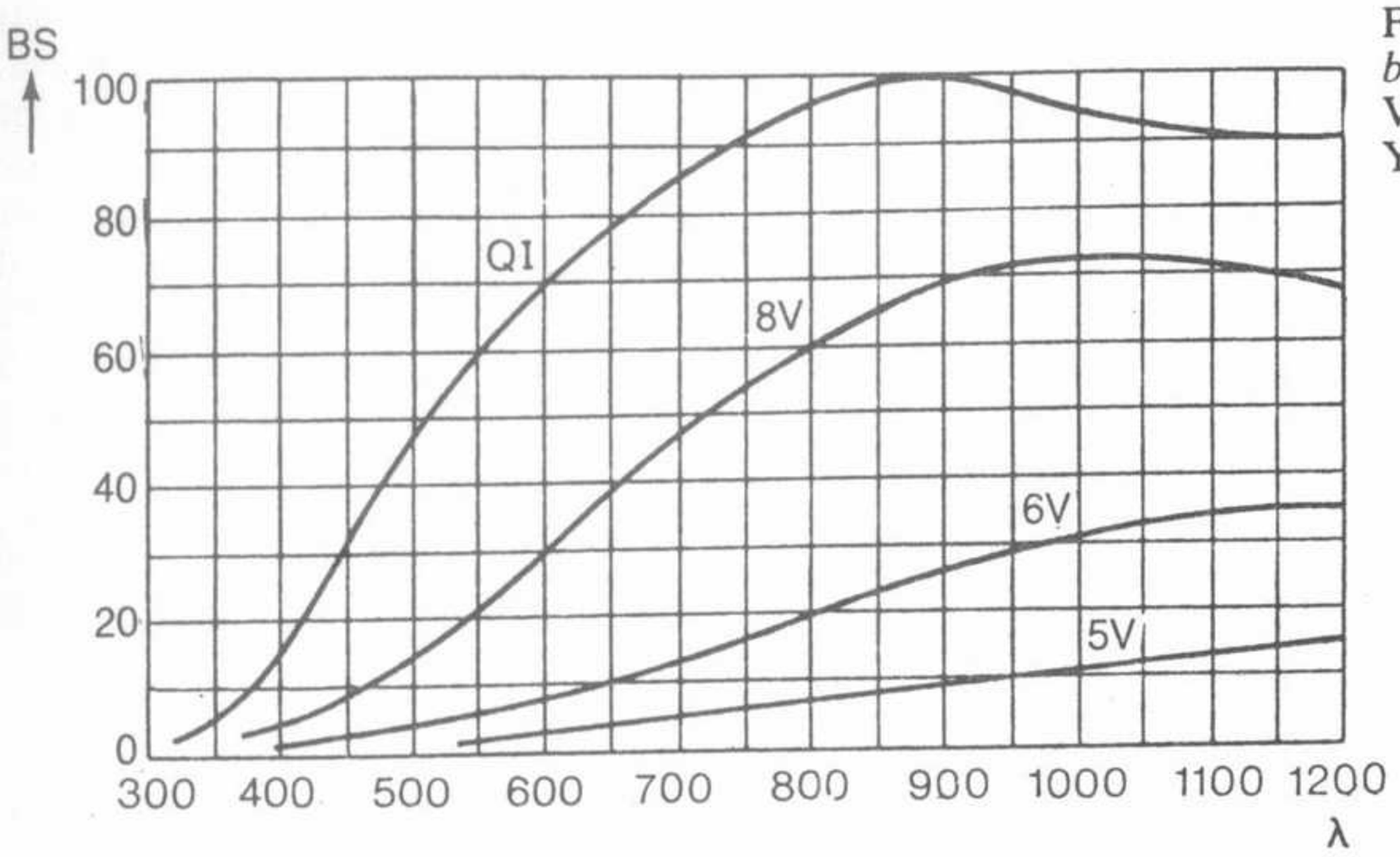


FIG. 21. — *Brillos espectrales relativos a bombillas de filamento de tungsteno.* 6 V-30 W, alimentadas con 5, 6 y 8 V y QI: Yodo cuarzo 12 V-100 W a 12 V.

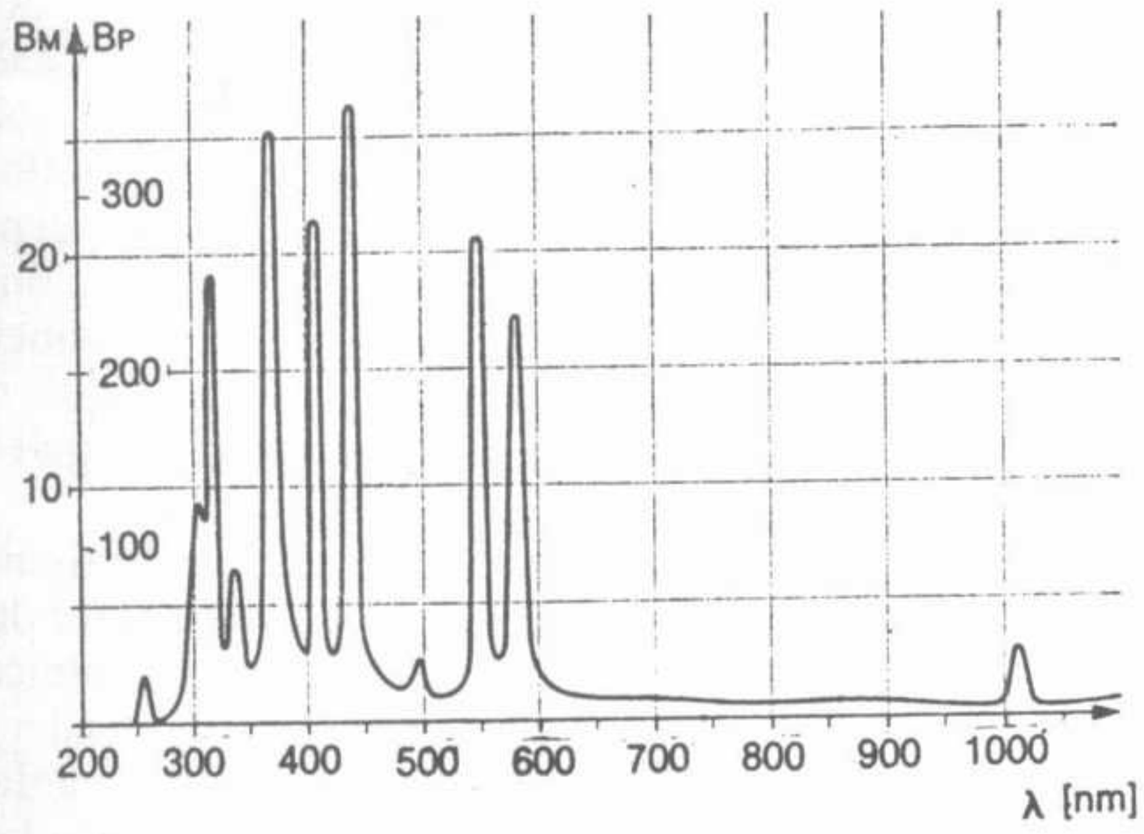


FIG. 22. — *Distribución espectral de la energía de la lámpara de vapor de mercurio* HG 100W *de Leitz.* Documento Leitz-Wetzlar.

tura de colores que resulta es también más elevada (fig. 21).

Lámparas de arco entre esferas de tungsteno. En este caso no se utiliza el brillo del arco sino el de una de las dos esferas que se pone incandescente. Su potencia es fija, no regulable.

Lámparas de arco concentrado o de circonio. Un pequeño crisol lleno de circonio es calentado por un arco situado entre su superficie y un electrodo anular. Es la superficie del circonio en fusión pero mantenido por la película superficial de óxido de circonio transparente que sirve de foco lumínico. El brillo obtenido es muy elevado y el foco, en forma de placa circular muy pequeña, es muy homogéneo.

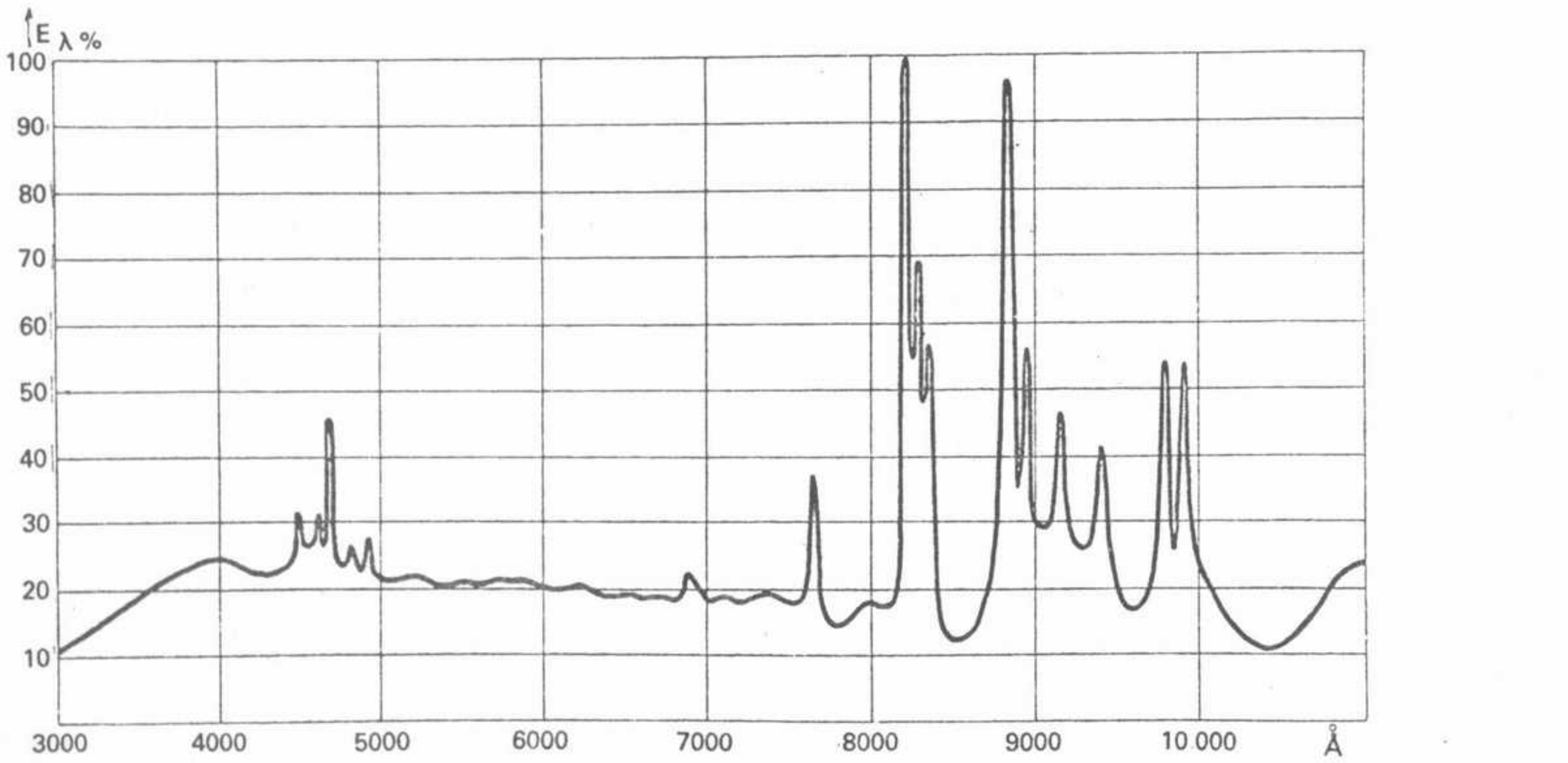


FIG. 23. — *Curva de emisión espectral de la lámpara Philips CSI, mercurio y yoduros metálicos.* Documento Philips.

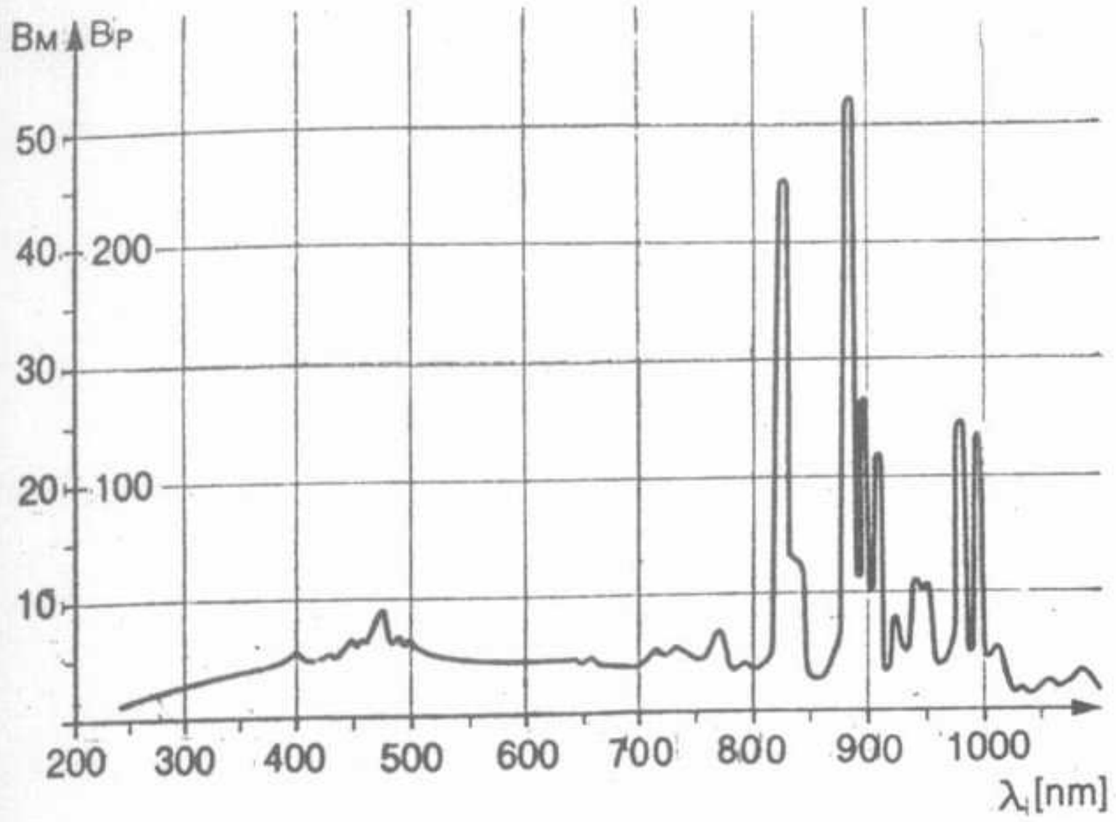


FIG. 24. — *Distribución espectral de la energía de la lámpara de Xenón* 150 W *de Leitz*. Documento Leitz-Wetzlar.

Lámparas de arco en una atmósfera gaseosa emisora. — Mientras en los dos tipos precedentes es la emisión térmica de un cuerpo calentado el que se utiliza, este tipo de lámpara de arco utiliza la emisión del gas excitado por el paso de la corriente en el arco. Resulta un espectro de bandas más o menos superpuesto a un espectro continuo, siguiendo la forma de la corriente de excitación y su resonancia con las moléculas de gas. De esta forma se consiguen focos totalmente monocromáticos para los microinterferómetros o focos muy potentes en el visible, el ultravioleta o el infrarrojo. El sodio y el mercurio son los dos gases más frecuentemente utilizados, así como el xenón cuando se quiere conseguir un fondo continuo. Las paredes de la lámpara son de cuarzo cuando se trabaja fuera del visible. Los electrodos internos son de tungsteno o de cadmio.

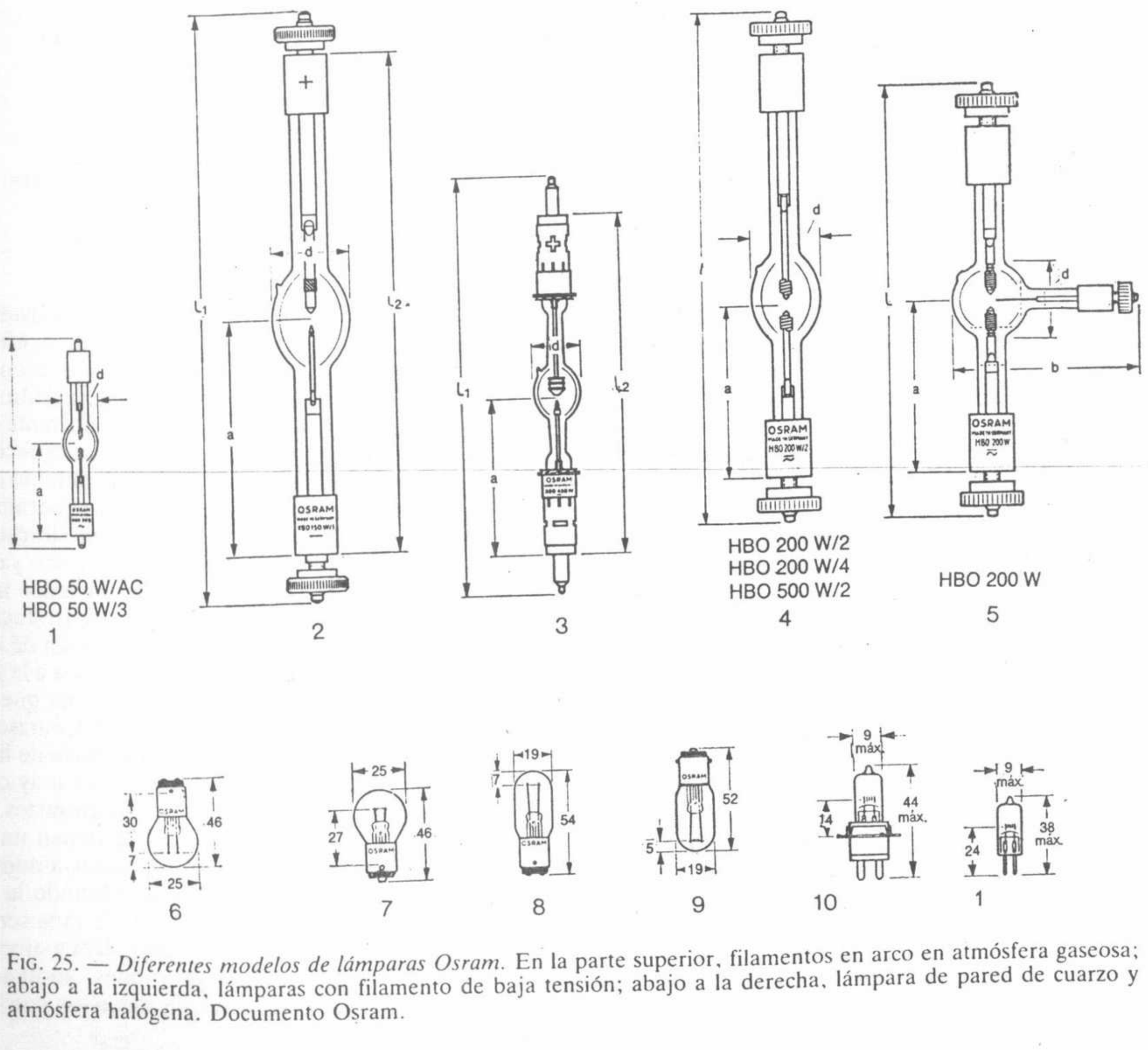


FIG. 25. — *Diferentes modelos de lámparas Osram.* En la parte superior, filamentos en arco en atmósfera gaseosa; abajo a la izquierda, lámparas con filamento de baja tensión; abajo a la derecha, lámpara de pared de cuarzo y atmósfera halógena. Documento Osram.

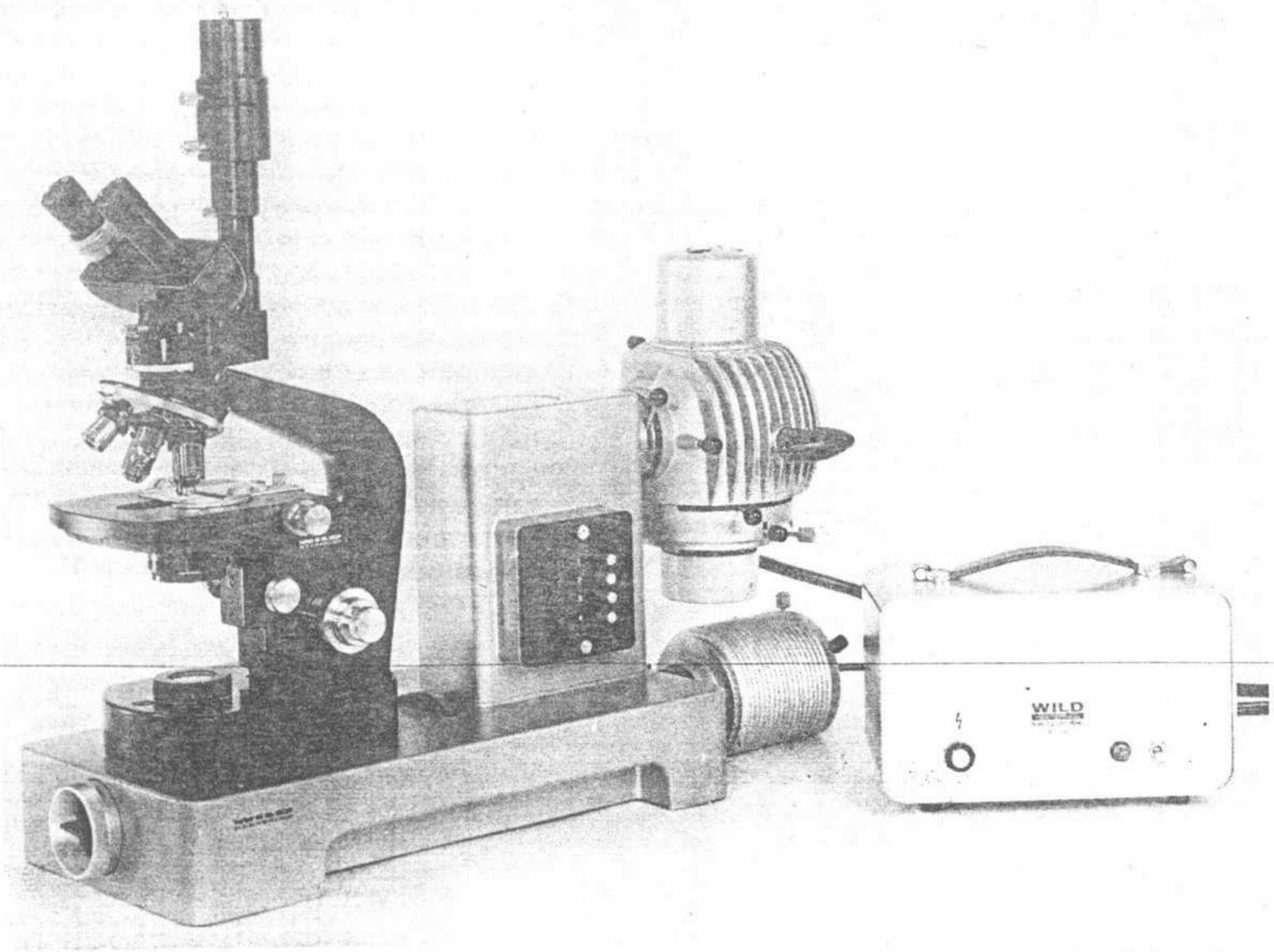


FIG. 26. — *Base de iluminación equipada con lámparas de gran potencia para microscopios de investigación.* Documento Wild-Heerbrugg.

LAS LÁMPARAS DE ILUMINACIÓN ELECTRÓNICAS EN FOTOMICROGRAFÍA

El uso del microscopio en fotomicrografía se encuentra de entrada con dos inconvenientes o límites: la disminución de la luz recibida por la superficie sensible que disminuye con el cuadrado de los aumentos y la movilidad que es amplificada por el «brazo de palanca óptica» del aumento, que esta movilidad sea intrínseca al objeto o bien debida a vibraciones parásitas. Para paliar estos dos límites, los constructores de microscopios han buscado focos de brillo cada vez más potente. Pero la iluminación continuada del material con estas nuevas fuentes no deja de presentar algunos inconvenientes: acciones letales sobre los objetos vivos o decoloración de las estructuras teñidas. En principio, las «lámparas de iluminación electrónicas» o los «flashes» tienen estos defectos amortiguados debido a que el tiempo de exposición a esta intensa luminosidad no excede algunas milésimas de segundo. La necesidad de combinar una iluminación de observación continuada con la iluminación ultrarrápida del tomavistas ha conducido a los constructores a diseñar dispositivos combinados en que el flash se encuentra o bien intercalado o en derivación con el sistema de iluminación normal del microscopio. Se efectúan los reglajes, las observaciones y las eventuales medidas de exposición con la iluminación continua, alimentada con una tensión constante y prefijada. Para la mayoría de los casos es recomendable utilizar lámparas que den un mínimo de 100 julios y un máximo de 400. La temperatura de color es de 5600 K, pudiendo ser modificada por el sistema óptico del microscopio, como ya se ha visto, dado que los vidrios no son todos incoloros. Una autoinducción puede ser introducida en serie en la alimentación del tubo, a fin de que la duración del relámpago no sea inferior a la 1/2000 enésima de segundo; ello es para evitar que tenga lugar el denominado efecto «de Schwarzschild». Este efecto tiende a reducir la eficacia de la capa sensible para tiempos de exposición muy cortos, reduciendo la sensibilidad y los contrastes.

Algunas cámaras automáticas tienen un sistema incorporado que permite cortar automáticamente la alimentación del tubo cuando la cantidad de luz óptima ha alcanzado la capa sensible. De no disponer de este equipo, deben efectuarse ensayos a diferentes regulaciones, anotando las indicaciones del aparato de medición con la ilu-

minación continua de la observación. Una gama de filtros neutros es útil para reducir la intensidad cuando se trabaja a pocos aumentos.

B. — *EMPLEO DEL MICROSCOPIO*

Los consejos que muy escuetamente daremos sobre el empleo del microscopio no son superfluos. Las reglas más elementales para el mantenimiento del microscopio son frecuentemente ignoradas, incluso por observadores consumados, y que por efectuar maniobras imprudentes, comprometen la duración de su instrumento o se ven privados de posibilidades que puede ofrecer el aparato.

FORMA DE COGER Y DE TRANSPORTAR EL MICROSCOPIO

Este punto es muy importante para no estropear el tornillo micrométrico. Los microscopios dotados de movimiento micrométrico horizontal deben cogerse por la potencia de forma acodada. Los modelos antiguos con movimiento micrométrico vertical deben cogerse por el pie. Muchas personas los cogen por la potencia que aguanta el tubo: se trata de un hecho deplorable que más o menos pronto estropeará el tornillo micrométrico. Efectivamente, cogiendo de esta forma el microscopio, todo el peso del aparato descansa sobre el tornillo, cuyas muescas son lentamente erosionadas.

Es innecesario decir que un microscopio no debe cogerse jamás por la platina, ni con mayor motivo por el tubo.

COLOCACIÓN DEL MICROSCOPIO

El buen rendimiento de un microscopio depende en gran parte de la instalación que se haya hecho de él, asimismo de ésta depende su longevidad y un manejo más o menos cómodo cuando se utiliza.

Generalmente los microscopios de laboratorio para la enseñanza y para la investigación son vendidos con un estuche. Este estuche debe ser cuidadosamente guardado para que el microscopio pueda ser colocado en él a fin de transportarlo, así como para guardarlo cuando no se utilice durante un cierto tiempo. Efectivamente, el polvo es un gran enemigo de la óptica, y las campanas o las fundas que obligatoriamente deben cubrir los aparatos, cada tarde, después de haberlos utilizado son totalmente insuficientes.

Para escoger el sitio donde colocar el microscopio nos basaremos en las siguientes consideraciones: que haya el mínimo posible de vibraciones, un ambiente de luminosidad amortiguada, orientado preferentemente hacia el norte; una estantería en la pared, a ser posible sobre una mesa; que el aparato esté orientado de cara a la pared, mejor que de cara a una ventana, a no ser que quieran hacerse observaciones con luz diurna: elección de la altura de la poyata y del asiento en función de la estatura del observador, del ángulo de inclinación del tubo de observación o del visor. La lámpara de trabajo deberá tener un regulador de intensidad lumínica, a fin de poder igualar la iluminación del campo observado y del papel sobre el que se dibuja o se toman notas. Esto es particularmente importante si se hacen dibujos con la cámara clara.

INSTALACIÓN DEL MICROSCOPIO

Agarrado convenientemente se saca el microscopio de su caja y se coloca sobre una mesa. A fin de asegurar su estabilidad y evitar que se deslice es conveniente colocarlo sobre un fieltro, o sobre una plancha de caucho o sobre un cuadernillo de papel de filtro. Se colocan los objetivos en el portaobjetivos o revólver, tomando la precaución de colocarlos con un orden creciente. Normalmente los objetivos son parafocales, es decir que una vez enfocado con uno, al seleccionar el siguiente queda prácticamente enfocado.

Sacar el ocular y regular la iluminación siguiendo el procedimiento indicado más adelante; debe disponerse el espejo hacia la fuente lumínica y disponiendo el condensador a una altura adecuada. Completar la iluminación tras haber vuelto a colocar un ocular de poco aumento a nivel del tubo ocular.

Para la observación microscópica es preferible trabajar *lejos de las ventanas* y sobre una mesa negra, a fin de eliminar toda luz parásita que deslumbra y disminuye la buena definición de las imágenes; estas precauciones evitarán una fatiga absurda.

ENFOQUE DEL MICROSCOPIO

Después de haber escogido un asiento de altura conveniente que permita observar sin fatigarse se coloca una preparación sobre la platina. Inicialmente, se debe tener a la altura de la vista un pequeño esquema de las distancias frontales y de los aumentos de los objetivos. Antes de colocar la preparación sobre la platina debe tomarse la precaución de levantar el tubo microscópico con la cremallera a una altura superior a la distancia frontal del objetivo de menos aumentos. Hecho esto, se centra la preparación, contemplando desde fuera, colocando la muestra en el centro de la abertura de la platina, se pone el ojo en el ocu-

lar y se hace bajar lentamente el tubo mediante la cremallera accionando el tornillo macrométrico. Cuando la imagen aparece se deja el tornillo macrométrico y se empieza a accionar el micrométrico, con el que se consigue un correcto enfoque.

Debe procederse con suma precaución al manejar el tornillo micrométrico, hay que recordar que su recorrido es limitado, por ello lo adecuado es dejarlo siempre en una posición central y únicamente accionarlo un poco hacia un lado y otro poco hacia el otro.

Si se llegara al extremo de su recorrido hay el riesgo de no poder volver a situarlo en posición correcta y al insistir pueden romperse las muescas y ello requiere cambiar todo el tornillo.

Si la imagen no aparece debe accionarse el macrométrico con suma precaución de no tropezar el objetivo contra la preparación. Este tropiezo puede conducir a la rotura de la preparación y estropear seriamente la lente frontal del objetivo. Es por ello que, si no aparece ninguna imagen, uno debe asegurarse mirando por fuera de acercar el objetivo a la preparación, sin que sobrepasemos la distancia frontal. En caso de acercarnos excesivamente entonces debe procederse a levantar lentamente el objetivo para luego volver a bajar suavemente. En caso de que continúe sin aparecer la imagen será debido a que hay que desplazar lateralmente la preparación para situar el objeto exactamente en el eje óptico. Si la preparación contuviera sólo escasas estructuras, y muy alejadas unas de otras, se puede intentar enfocar sobre una burbuja de aire o sobre el límite del cubreobjetos. De esta manera, podemos encontrar la distancia frontal del objetivo de menor aumento y desplazando metódicamente la preparación, y pronto se situará una de las estructuras en el centro del campo. Combinando todos estos movimientos pronto se logrará enfocar con el objetivo de pequeño aumento.

Accionando el revólver se pasa de la utilización de un objetivo a otro de mayor aumento. Cuando el microscopio está bien ajustado basta con hacer girar el revólver y modificar ligeramente el enfoque con el tornillo micrométrico para que la preparación quede enfocada.

Siguiendo estas recomendaciones es seguro que el principiante no estropeará sus preparaciones ni ensuciará sus objetivos. Por otro lado, esta debe ser la forma de proceder de todo microscopista que se considere como tal. Cuando se tiene un poco de costumbre estos movimientos se hacen con rapidez, únicamente se trata de practicar desde el principio y seguir este orden señalado hasta adquirir el hábito, con lo que se procederá a hacer un examen metódico de la preparación. ¡Cuántas veces hemos contemplado cómo se inicia la observación de un corte a unos 300 o 400 aumentos e incluso con el objetivo de inmersión! Es por esta falta de método que hay graves errores y que motiva cierto recelo a determinadas personas a usar el microscopio. Si por el contrario, al empezar la observación de la preparación se hace con el objetivo de pequeño aumento se facilita el enfoque, se obtiene una imagen de conjunto de la topografía de la estructura y sin dificultad podemos centrarnos en los puntos de máximo interés. Y son éstos que posteriormente se observarán con ojetivos de mayor aumento.

ENFOQUE CON LOS OBJETIVOS DE INMERSIÓN

La utilización de estos objetivos requiere alguna explicación previa, dado que para utilizarlos no basta con hacer girar el revólver. *Ante todo debemos asegurarnos con el objetivo de pequeño aumento de que hay algo a observar en el centro del campo;* esta precaución es indispensable, dado que es sumamente difícil buscar las estructuras con el objetivo de inmersión debido a su escasa distancia frontal y al hecho de que su campo visual sea muy pequeño. El objetivo de pequeño aumento es indispensable para regular la iluminación previa observación a mayor aumento.

Una vez bien iluminado y centrada la estructura hay que elevar el tubo y seleccionar el objetivo de inmersión colocándolo en el eje óptico del sistema; seguidamente se coloca una gota de aceite de inmersión en el centro de la preparación. Siempre que sea posible deberá utilizarse el aceite de inmersión proporcionado por el fabricante del objetivo y cuyo índice de refracción se calcula para la corrección de las lentes.

Hecho esto se baja el tubo con un movimiento rápido, mirando el microscopio por el lado, de manera que se introducirá la lente frontal del objetivo de inmersión dentro de la gota de aceite. La gota debe haber conservado su convexidad, es por ello que no debe esperarse que la gota se extienda sobre la preparación, en caso de que ello ocurriera deberá colocarse una segunda gota pequeña. Una vez establecido el contacto es cuando se aprecia inmediatamente un cambio de la forma de la gota y es entonces que se levanta ligeramente el objetivo, pero sin que deje de perder contacto con dicha gota. Colocando el ojo sobre el ocular se mueve lentamente el tornillo micrométrico una vez nos haya aparecido la imagen tras haber accionado previamente el tornillo macrométrico.

Una vez terminada la observación es indispensable volver a levantar el tubo con un movimiento rápido de forma que alejemos la lente frontal de la preparación. Hecho esto se retirará la preparación sin temer a estropear la lente frontal por un posible rozamiento contra el portaobjetos.

Esta misma precaución debe tomarse cuando se trabaja con objetivos de gran aumento en seco.

Limpieza de los objetivos de inmersión. — Una vez terminada la observación deberá procederse a la eliminación del aceite adherido a la lente frontal. Es una muy mala costumbre la de dejar secar el aceite de un día para otro, dado que cuando se pretende sacar se corre el riesgo de rayar la lente o de hacer penetrar en el objetivo una parte del disolvente que se está obligado a utilizar. Es por ello que debe secarse cuidadosamente el aceite con un trozo de papel especial para la limpieza de gafas. No debe sumergirse nunca el extremo del objetivo en ningún tipo de líquido, dado que es altamente peligroso, que puede provocar el desprendimiento de lentes.

Por consiguiente, no comprendemos cómo determinadas personas se atreven a recomendar eliminar el aceite de inmersión con disolventes, tipo xilol o alcohol. Estos líquidos únicamente pueden disolver el cemento que fija la lente frontal a su montura y provocar así un deterioro irremediable del objetivo. Es por todo ello que no debe usarse nunca alcohol, ni el benceno, ni el xilol, ni el tolueno para la limpieza de los objetivos de inmersión.

CAUSAS DE ERROR EN EL ENFOQUE

Puede ocurrir que, a pesar de todas las precauciones adoptadas, no se llegue a enfocar; ello ocurre generalmente cuando se trabaja con objetivos de gran aumento y puede ser motivado a dviersas causas, de las cuales tres son las más frecuentes y describiremos a continuación (las restantes se indicarán más adelante).

1.° **Revólver mal centrado.** — En este caso es imposible llegar a encontrar un objeto que había sido previamente enfocado a pequeño aumento, cuando se trabaja a mayor aumento. Este accidente se da frecuentemente cuando se observa una preparación en la que hay poca muestra y ésta se halla dispersa. Para evitar este defecto de centrado que puede darse en los revólveres mejor construidos, hay que reenfocar para centrados sucesivos, primero con el objetivo de menor aumento, después con el de mediano hasta llegar al objetivo de mayor aumento. Estos centrados sucesivos permiten también apreciar cuánto hay que desplazar la preparación para centrarla definitivamente, al pasar de un objetivo de pequeño aumento a otro de mayor poder amplificante.

2.° **La preparación está girada al revés.** — Este pequeño accidente sucede con mayor frecuencia de lo que podamos imaginar e incluso acontece a los microscopistas más expertos, principalmente ocurre en el caso de las extensiones de sangre y en el caso de las preparaciones montadas en bálsamo muy secos. A pocos aumentos uno no se da cuenta de este error y nos quedamos extrañados cuando no logramos enfocar con el objetivo de inmersión ni tampoco con el de 40 aumentos. Efectivamente, a partir de unos 300 aumentos, la distancia frontal de los objetivos es demasiado corta para poder enfocar la parte inferior del portaobjetos. En este caso no se debe insistir, sino levantar inmediatamente el tubo y asegurarse de que la preparación esté bien colocada. Y es en este momento cuando se constata que está al revés.

Para evitar este contratiempo siempre hay que comprobar, antes de poner la preparación sobre la platina, la posición del cubreobjetos con la uña. En el caso de las extensiones que no lleven cubreobjetos se hará la comprobación poniendo el portaobjetos de tal manera que por reflexión veamos el lado mate que es el portador de la capa sanguínea.

3.° **El portaobjetos es demasiado grueso o bien hay dos cubreobjetos superpuestos.** — Se produce el mismo fenómeno que cuando la preparación está al revés. La lente frontal tropieza contra el portaobjetos y la imagen no aparece o, en caso de verse, está altamente borrosa.

Este percance no suele ser tan frecuente como el anterior, debido principalmente a que la distancia frontal de los objetivos, incluso de los de mayor aumento, es suficientemente grande para impedir este inconveniente. Los cubreobjetos que encontramos en el comercio tienen también una delgadez bastante regular. Sin embargo, en el caso de que la preparación sea muy espesa puede ocurrir que no pueda llegarse a enfocar los diversos planos del material, incluso con los objetivos actuales. No debe insistirse dado que llegaríamos a romper el cubreobjetos, aplastar el material y quizás estropear irremediablemente la lente frontal del objetivo. Debemos añadir que con los movimientos que actualmente se someten los tornillos micrométricos es menos fácil de romper la preparación, dado que el tornillo deja de actuar cuando entra en contacto con el cubreobjetos.

MANIOBRAS CON EL TORNILLO MICROMÉTRICO Y OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Durante la observación microscópica el ojo se encuentra aplicado contra el ocular, una mano acciona continuamente el tornillo micrométrico y la otra desplaza lateralmente la preparación mediante el carro móvil aplicado sobre la platina.

1. **¿Con qué ojo se debe observar al trabajar con un modelo monocular?** — Las opiniones son muy dispares al respecto: la mayoría de los teóricos creen que debe observarse con el ojo izquierdo. Se da como razón para adoptar esta actitud el hecho de que el ojo derecho debe estar libre para poder dibujar la preparación con o sin cámara clara.

En la práctica, esta regla es observada en pocas ocasiones. En principio, cabe señalar que muchas personas tienen una gran dificultad para mirar con el ojo izquierdo e instintivamente se mira con el ojo derecho, resulta más cómodo, a no ser que se empiece a practicar con el izquierdo desde el inicio del aprendizaje del uso del microscopio. Se puede mirar con uno u otro ojo, depende de la conveniencia personal. Los que puedan trabajar alternativamente con los dos ojos tienen una gran ventaja que les permite evitar la fatiga que indudablemente condiciona la observación monocular.

2. **¿Se debe tener un ojo cerrado?** — Al igual que otros muchos autores recomendamos observar con *los dos ojos abiertos*. Es muy cansado, sobre todo al hacer una observación algo prolongada, tener un ojo cerrado: la contracción muscular por un lado, la presión ejercida sobre el globo ocular por otra parte, provocan rápidamente un cansancio e incluso dolor ocular y de cabeza. Resulta relativamente fácil habituarse a mirar con los dos ojos abiertos; al cabo de poco tiempo sólo se llegan a apreciar las imágenes procedentes del ojo aplicado al ocular del microscopio. Es importante que la mesa donde se halla ubicado el microscopio no esté más iluminada que el campo de observación; en el caso de que la mesa fuera blanca (esmaltada) o de color claro habrá que cubrirla con un papel oscuro o negro. De esta manera el ojo que no se utiliza en la observación únicamente recibe una escasa cantidad de rayos luminosos y ofrece imágenes poco iluminadas para poder alterar la percepción del otro ojo.

PANTALLAS OCULARES. — Cuando se tienen que efectuar observaciones prolongadas, a grandes aumentos, es muy importante proteger los dos ojos de los rayos lumínicos periféricos, es decir, de otros que no sean los procedentes del microscopio. Es justamente con esta finalidad que se han diseñado pantallas oculares y gorros destinados a evitar que se formen imágenes a nivel del ojo que no está sobre el ocular a la vez que protegen el ojo que observa contra los rayos reflejados por la montura del microscopio o procedentes directamente de la fuente lumínica.

El más sencillo de estos artilugios puede confeccionarse con una delgada hoja de cartón negro recortado con la forma de la órbita del ojo. Se hace pasar el tubo ocular por el agujero circular del cartón. Se ha recortado el espacio correspondiente a la nariz. Con esta forma de pantalla tan rudimentaria se puede dibujar cómodamente con la cámara clara, dado que toda una parte del microscopio queda despejada.

Stiassnie fabrica una pantalla doble recubierta de terciopelo verde. Este aparato, inventado por el Dr. Et. Sergent es sumamente cómodo y permite observar con uno u otro ojo; su único defecto reside en el hecho de que cuando se utiliza no puede emplearse la cámara clara, dado que ocupa simultáneamente los dos lados del microscopio. Se fija sobre el tubo microscópico mediante una arandela. Junto a estas pantallas oculares, a fin de completar adecuadamente su función, debe instalarse una gran pantalla negra montada sobre el pie del estativo del aparato. Un sistema muy sencillo de fabricar estas pantallas consiste en utilizar un pequeño soporte con embudos de hierro. Sobre uno de los anillos, que se tiene la precaución de girar verticalmente, se fija una gran hoja de cartón negro o recubierto de papel negro, mediante un hilo de latón. Recomendamos vivamente el empleo de una pantalla de este tipo, sobre todo cuando se trabaja con luz artificial intensa. A la vez permite regular muy fácilmente la iluminación del papel cuando se trabaja con la cámara clara. Pantallas de este tipo, con una superficie más o menos curvada, existen en el comercio.

Observación binocular

Con el binocular ante todo deben regularse correctamente los dos tubos oculares; ello depende de la distancia interpupilar, y se consigue cuando hay una total fusión de las dos imágenes. La córnea ocular debe estar suficientemente próxima a la lente ocular para que todo el campo circunscrito por el diafragma sea observado con un simple vistazo. Cerrando alternativamente un ojo y después el otro se apreciará una diferencia más o menos acusada del enfoque; para corregir este defecto habrá que accionar un tornillo de ajuste que lleva uno de los dos oculares. Si el observador tiene astigmatismo debe conservar sus gafas puestas, verificando previamente que los oculares utilizados tengan una pupila de salida suficientemente alejada del cristal de la gafa para evitar que éste roce con la lente ocular, dado que existe el peligro de que ambas lentes se rayen. Si los vidrios correctores, a pesar de todo, contactan y no es posible cambiar de oculares pueden montarse estos vidrios correctores en lentes suplementarias colocadas sobre cada ocular. En este caso, si estos vidrios corrigen un cierto astigmatismo no debe olvidarse hacer un trazo negro sobre el vidrio corrector indicando la dirección del plano sagital de la orientación.

Para explorar rápidamente una preparación no debe desplazarse de forma continua, pero sí a determinados pasos, siguiendo una determinada pauta, cada paso debe equivaler unos dos tercios del diámetro del campo de observación. Para cada campo, observado en estado estático, el observador debe imponerse el hecho de observar únicamente el centro del campo, tras haberse entrenado en la visión periférica. Para llevar a cabo

este entrenamiento basta con practicar una lectura rápida y conseguir apreciar unas 6000 palabras-minuto. Se sabe que para hacer este tanteo no debe leerse palabra por palabra siguiendo la línea, sino toda la línea de una vez. El entreno de la visualización periférica presenta otras ventajas: esta parte de la retina es más sensible a las débiles iluminaciones; para ello se disminuirá la intensidad lumínica del microscopio y el efecto deslumbrador se amortiguará considerablemente al pasar de un campo con estructura visible a otro en el que no hayan estructuras observables. Una vez más insistimos en el hecho de que el ojo que observa al microscopio es mucho más fácilmente deslumbrado que el otro, dado que a grandes aumentos, del pequeño diámetro del haz luminoso a nivel de la pupila de salida del ocular, que coincide con la pupila de entrada del ojo, el iris, aunque esté cerrado al máximo no puede diafragmarlo y la reducción producida por este acto reflejo producido sobre la retina no actúa.

Para amortiguar este inconveniente, A. Arnulf había diseñado un ocular con la lente ocular giratoria, con lo que lograba alargar la pupila de salida. Es finalmente otra solución la que ha prevalecido: es la de un mosaico de microlentes funcionando como una pantalla de proyección y girando a gran velocidad. El resultado es excelente y la observación es mucho más confortable, dado que la posición del ojo es mucho menos crítica. Este dispositivo podría todavía mejorarse permitiendo una visión estereoscópica con un aparato monoobjetivo.

Sabemos que la visión estereoscópica sobre pantalla con un aparato biobjetivo ha sido realizada de otra forma, con la ayuda de una lente de Fresnel convenientemente situada.

Manejo del tornillo micrométrico

Ya hemos indicado en diversas ocasiones que durante la observación microscópica la mano derecha debe mover continuamente el tornillo micrométrico. Sabemos que el microscopio únicamente puede enfocar un solo plano de las estructuras, es por ello que no podemos observar con nitidez y simultáneamente todos los planos de la estructura a estudiar. Por pequeñas que sean las estructuras debemos pensar que tienen tres dimensiones, incluso cuando observamos un corte, los elementos figurados que la forman tienen un cierto grosor. No podemos pues saber cuál es la forma y cuáles son las relaciones existentes entre los diversos elementos de no imaginarnos toda una serie de cortes ópticos que habremos examinado sucesivamente accionando el tornillo micrométrico.

La nitidez de esta percepción puede asegurarse por dos sistemas: la puesta a punto del sistema óptico y el poder de acomodación del ojo. Debemos señalar que este último no debe influir en la observación microscópica. Efectivamente, si el enfoque es insuficiente y, si por vía refleja el ojo se esfuerza para remediarlo mediante modificaciones de su curvatura, aparece rápidamente un cansancio intenso de los músculos acomodadores. Por el contrario, modificando continuamente el enfoque por el tornillo micrométrico, el ojo funciona como si fuera un punto en el infinito, es decir, forma sobre la retina una imagen nítida del objeto, sin que su mecanismo acomodador se ponga en acción.

Es por ello que vemos que es necesario accionar el tornillo micrométrico de forma continua, por dos razones:

1.° Enfocar sucesivamente los distintos planos de la estructura a fin de conocer su forma por la superposición de cortes ópticos sumamente delgados.

2.° Asegurar la nitidez de estas imágenes retinianas sucesivas, sin que el mecanismo de acomodación haya entrado en juego.

No nos cansaremos de recomendar a los debutantes que accionen adecuadamente el tornillo micrométrico, dado que es el único sistema de observar sin cansarse, sin peligro para el ojo y de evitar los errores procedentes de una exploración insuficiente de planos sucesivos de las estructuras.

Manejo de la platina con carro móvil

La mano izquierda del observador, tras haber regulado la iluminación desplazando el condensador de forma adecuada y accionando el diafragma iris, desplaza la preparación mediante el carro móvil acoplado a la platina móvil. Inicialmente se desplaza la preparación, por etapas sucesivas, de delante hacia atrás: cada fracción es estudiada por toda su extensión, mediante un desplazamiento lateral (fig. 27).

A falta de platina móvil, la preparación es cogida por sus extremos, entre el pulgar y el índice, el mediano se apoya sobre la platina. De esta manera puede hacerse deslizar la preparación de forma uniforme y así poder explorar toda su superficie.

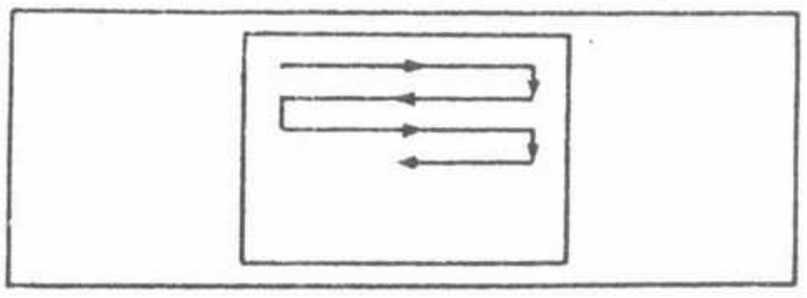


FIG. 27. — *Recorrido a seguir para explorar metódicamente una preparación.*

ELECCIÓN DE LOS OBJETIVOS Y DE LOS OCULARES

Se ha indicado la conveniencia de observar siempre una preparación empezando por el objetivo de pequeño aumento y seguidamente con objetivos de aumentos superiores. Sabemos que la imagen pierde en superficie y en nitidez a medida que los aumentos son superiores. Este incremento de aumento debe obtenerse mediante objetivos cada vez más potentes: en principio no debe obtenerse a partir de los aumentos del ocular. Efectivamente, el ocular sólo incrementa la imagen dada por el objetivo: cuanto más aumentos tiene el ocular mayor es la pérdida de nitidez que presenta la imagen, de claridad y de superficie. Es por ello que para las observaciones rutinarias se trabajará con oculares de escasos aumentos, o de medianos, y únicamente se conseguirá incrementar el poder amplificante mediante objetivos más potentes. Los oculares de gran aumento se reservarán para casos particulares; tenemos que tener siempre presente el hecho de que disminuyen la definición y que no incrementan la resolución. Ya hemos indicado anteriormente que el aumento de la imagen dado por una combinación óptica no es una prueba de su valor en lo que respecta al poder de resolución y al poder de definición del sistema óptico.

C. — LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Los capítulos que preceden nos han hecho conocer las partes de un microscopio y la manera de utilizar cada una de ellas. Es importante señalar estas nociones fundamentales dado que nos ahorran mucho tiempo y muchos tanteos. Algunos autores afirman que, de hecho, no pueden establecerse unas normas de manejo y que únicamente la costumbre, la experiencia, es el único sistema válido para disponer la iluminación adecuada y poner de manifiesto el mayor número posible de detalles de las preparaciones. No somos de esta misma opinión. Por el contrario, consideramos que deben establecerse unas normas concretas, teniendo como base científica las propiedades físicas del microscopio y de sus diversas partes. La correcta aplicación de estas reglas o normas es evidentemente cuestión de práctica pero su conocimiento es indispensable en microscopia. Si no las tiene en cuenta el principiante deberá volver a rehacer toda una serie de maniobras, frecuentemente infructuosas, que permitieron a sus predecesores disfrutar de todas las ventajas que puede aportar el microscopio.

A continuación trataremos de la observación microscópica, es decir, de la percepción ocular de las imágenes ofrecidas por el microscopio, de forma de poder apreciar las imágenes sin cansancio y en condiciones óptimas, evitando cometer errores y apreciar ilusiones ópticas, a diferenciar las que puedan formarse.

CONDICIONES DE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

Para intepretar adecuadamente las imágenes que ofrece el microscopio debe conocerse la naturaleza de la visión óptica. Si nos damos cuenta de que se trata de una visión especial, una forma muy particular de observar los objetos, totalmente diferente a la que estamos acostumbrados, nos evitaremos muchas dificultades y numerosos errores.

La visión normal es binocular, por lo que nos da la sensación de la distancia y del relieve. Esta sensación se debe a la superposición de dos imágenes retinianas y a la fusión de las dos percepciones correspondientes. Estas dos imágenes no son idénticas, diferenciándose cuanto más cercano se encuentre el objeto con respecto a la lente; de la misma manera que la sensación de relieve disminuye a medida que nos alejamos de este objeto. La imagen microscópica nos viene dada por la *visión monocular*, ¡aunque se trate de un tubo binocular!, es por lo que al observar al microscopio debemos hacer una abstracción de la educación primitiva del ojo y apreciar por otros medios el relieve y el grosor de los cuerpos.

En la visión normal, el mecanismo de la acomodación nos permite observar nítidamente, uno después de otro, pero no simultáneamente, objetos situados a distintas distancias. En la visión microscópica, el *mecanismo de la acomodación no entra en juego:* simultáneamente, sólo se aprecia un plano delgado del objeto a examinar y, para observar los otros planos, debemos variar el enfoque del sistema óptico. Únicamente vemos uno de estos planos plenamente enfocado, por lo que debemos retener la información de cada una de estas observaciones para finalmente reconstruir la imagen global. Cuanto mayores sean los aumentos del microscopio mayor es el número de planos que deberemos enfocar, uno por uno, con el tornillo micrométrico, a fin de apreciar el grosor y el relieve de las estructuras.

Otra importante diferencia existente entre la visión normal y la visión microscópica reside en el *tipo de iluminación*. Los objetos que nos rodean son observados por procesos de reflexión gracias a la luz que difunden. Al microscopio, la gran mayoría de las preparaciones son observadas por luz transmitida, es decir, por transparencia, por lo cual los fenómenos de refracción juegan un papel mucho más importante que en la visión del ojo normal. Bajo este aspecto debemos catalogar las imágenes microscópicas en dos grupos.

Unas son las que obtenemos a partir de *preparaciones teñidas* que *absorben* una importante cantidad de radiaciones lumínicas; estas imágenes muestran el color y los contornos de los objetos. Las otras imágenes son las que obtenemos a partir de preparaciones *incoloras*, es el caso que se da cuando observamos materiales en fresco, sin previa tinción. Estas preparaciones actúan sobre los rayos lumínicos por *difracción* y *refracción*; no solamente permiten observar los contornos de las estructuras, sino también sus detalles internos, simplemente por las diferencias de refringencia existentes entre ellas o por los contrastes entre la luz y la sombra. La visión microscópica también difiere de la visión normal por la gran abertura del cono de iluminación de las preparaciones. Las dimensiones de este cono de iluminación influyen mucho sobre la naturaleza de los fenómenos de refracción.

Finalmente, podemos añadir que la visión microscópica difiere de la visión normal por la *naturaleza del medio* en el que se encuentra el material a observar. Estamos acostumbrados a observar objetos que están inmersos en el aire; al microscopio, por el contrario, observamos preparaciones que están montadas generalmente en un medio líquido. Efectivamente, el montaje en aire es prácticamente inviable, dado que habría procesos de desecación de las muestras que conduciría a una deformación importante por desecación; por otra parte, la introducción de aire en los intersticios de las estructuras o de los tejidos produciría fenómenos de refracción de tal tipo que no podríamos discernir ninguna estructura. Es por ello que deben montarse los materiales en un medio líquido, que evite su desecación y cuyo índice de refracción sea tal que permita apreciar los detalles más insignificantes. El aspecto de las estructuras varía considerablemente atendiendo al valor del índice de refracción del medio donde se han montado. Si el material tiene el mismo índice de refracción del medio de montaje no es visible. Si el material es más refringente que el medio presenta las características de un cuerpo sólido; finalmente, en el caso de que sea menos refringente que el medio, toma la apariencia de un cuerpo hueco. Ranvier propuso un magnífico ejemplo para concretar estos fenómenos. Se cogen tres frascos de aspecto parecido, que contengan agua, sulfuro de carbono y bálsamo del Canadá; en cada uno de los frascos se introduce una varilla de vidrio. En el primero observamos la varilla perfectamente bien, dado que el vidrio es más refringente que el agua; en el segundo frasco nos aparece hueca, dado que el vidrio es menos refringente que el sulfuro de carbono y, finalmente, en el tercer frasco la varilla no es visible y ello es debido a que el vidrio y el bálsamo del Canadá tienen el mismo índice de refracción.

Este primer ejemplo, aunque grosero, nos permite apreciar hasta qué punto puede cambiar el aspecto de un determinado material atendiendo a la refringencia del medio de montaje. Para mejor comprender los fenómenos que ocurren en la observación microscópica, vamos a estudiar dos estructuras de forma bien determinada, muy frecuentes en las preparaciones microscópicas y de las que deben conocerse bien sus propiedades ópticas. Se trata de las burbujas de aire y de las inclusiones lipídicas.

Burbujas de aire en el agua

Se coloca una gota de agua o de saliva entre porta y cubreobjetos, con lo que quedan aprisionadas algunas burbujas de aire. Se escoge una de las burbujas de menor tamaño a fin de que no sea comprimida y que, por consiguiente, guarde y mantenga su forma esférica. Debe tenerse la precaución de diafragmar bastante el condensador (fig. 28).

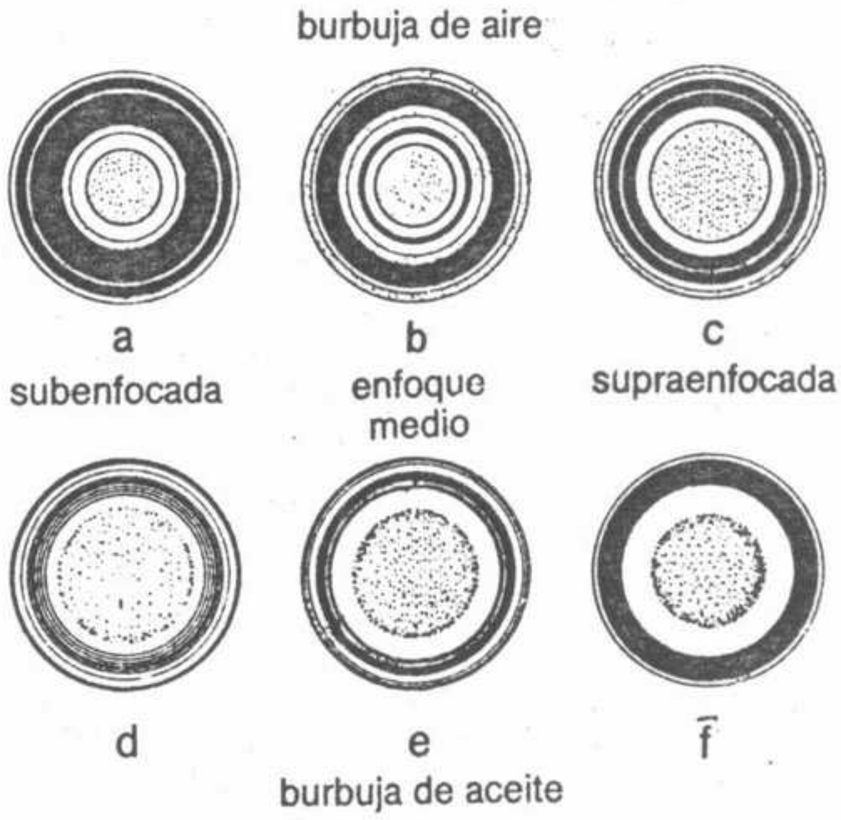


FIG. 28. — *Imágenes de bolas de aire en el agua y de aceite en el agua en tres planos de enfoque: inferior, medio y superior.*

Ante todo, enfoquemos la burbuja de manera que se observe con toda nitidez (fig. 28b); veremos entonces el centro formado por un círculo muy brillante, rodeado de una zona grisácea y después por un ancho anillo negro formado por múltiples círculos concéntricos claros y delgados, que corresponden a franjas de difracción.

Si se baja ligeramente el objetivo, de forma que podamos enfocar la parte inferior de la burbuja, el círculo central blanco se hace más pequeño y a la vez más claro; a la vez que se aprecia con mayor nitidez y ha desaparecido su borde grisáceo. El anillo negro que lo circunda es más ancho y provisto en la periferia de varios anillos de difracción (fig. 28a).

Finalmente, si procedemos a enfocar la parte

superior de la burbuja, vemos aumentar el grosor del círculo blanco central. A la vez que aparecen alrededor de él anchos círculos grises, rodeados por un anillo negro mucho más estrecho que el anterior. Este anillo negro tiene su borde externo invadido por numerosos círculos de difracción (fig. 28c).

Estas distintas apariencias se explican como motivación del fenómeno de la reflexión total (aparte los anillos de difracción). El haz luminoso que atraviesa la burbuja de aire puede ser considerado como formado por los rayos paralelos. Entre estos rayos, tras refracciones, únicamente penetrarán en el objetivo aquellos cuya inclinación, con respecto al eje óptico, no sobrepase, por un lado, el valor del ángulo límite por el paso del agua en el aire (48°) y por otro, la mitad del ángulo de abertura del objetivo, medido con relación al agua. Los otros sufrirán la reflexión total; es por los que los bordes de las burbujas aparecen oscuros. La figura 29 pone de manifiesto este fenómeno, a la vez que explica las variaciones de dimensiones del anillo oscuro. Los rayos *a'* y *a"* son los únicos que penetran en el objetivo, dado que el ángulo de abertura no es suficiente para recoger el rayo *a"'*. En cuanto al rayo *a""* sufre una reflexión total, dado que sobrepasa el ángulo límite. Supongamos ahora que enfoquemos el plano *xy* que pasa por el eje de la burbuja de aire; el círculo de aire central tendrá por diámetro Ca_2" dado que el ojo percibe el rayo *a"* en la dirección en que ha sido refractada. Por el contrario, si enfocamos la parte inferior de la burbuja únicamente observaremos un círculo claro que tiene por diámetro C_1a_1". Finalmente, enfocando la parte superior de la burbuja, el círculo claro aparece más ancho (C_2a_3"). En cada una de estas posiciones del objetivo, la zona oscura corresponde a la parte de la burbuja situada exteriormente al rayo *a"*. En resumen, la burbuja de aire actúa como si se tratara de una lente biconvexa y transforma el haz paralelo en un haz divergente.

Comparando las figuras 28 y 29 se apreciará cómo estos datos teóricos corresponden casi exactamente a los resultados proporcionados por el ejemplo estudiado.

Efectivamente, observando la burbuja de aire, vemos cómo el borde no es del todo oscuro y ello es debido a que los rayos tienen una refracción excesivamente grande para poder penetrar en el objetivo y son parcialmente reflejados hacia el interior de la burbuja y, de esta manera, son apreciados por el ojo del observador. Este fenómeno suplementario explica por qué la zona clara y la zona oscura no siempre están bien delimitadas.

Finalmente, hemos apreciado la presencia de numerosos anillos de difracción, ello es debido a que la zona oscura de la burbuja actúa sobre el haz luminoso como si se tratara de un diafragma

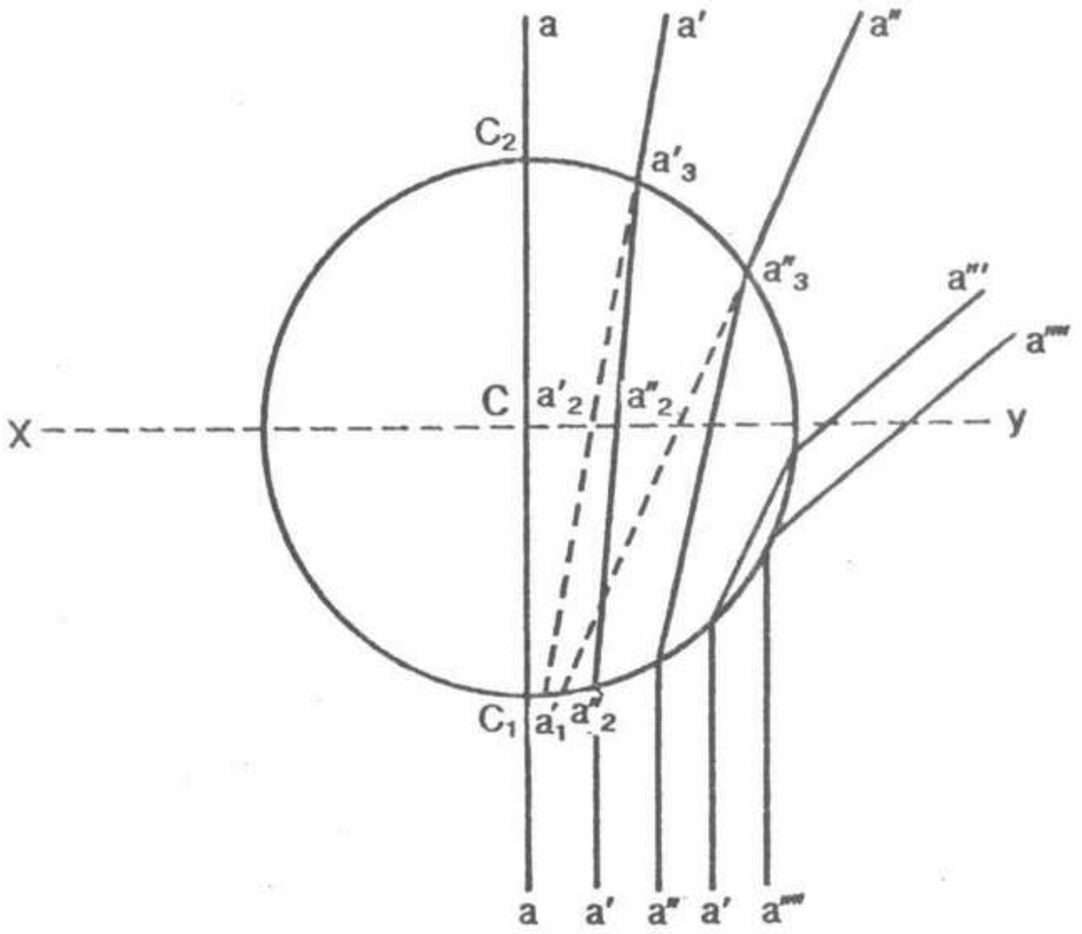


FIG. 29. — *Marcha de los rayos en una bola de aire observada en el agua.*

y de esta manera se producen las franjas de difracción. Cuanto más cerrado esté el diafragma, es decir cuanto más estrecho sea el círculo claro, el número de anillos será superior, es decir su número aumenta a medida que se enfocan las partes más profundas de la burbuja. Cuanto más pequeño sea el ángulo de abertura del haz de iluminación más diferenciados aparecen los círculos.

Burbuja de aire en el bálsamo del Canadá

Es muy fácil aprisionar burbujas de aire en el bálsamo del Canadá, o equivalente: basta agitarlo con una varilla de vidrio. Sabemos que el ángulo límite es más pequeño cuanto mayor sea la diferencia entre el índice de refracción de los dos medios. Por ello, en el bálsamo del Canadá, que es mucho más refringente que el agua, únicamente los rayos que incidan muy cerca de la burbuja de aire serán los que podrá apreciar el observador.

Inclusiones lipídicas en el agua

Se agita en un frasco con una decena de centímetros cúbicos de agua una gota de aceite. Se extrae una gota de dicha emulsión y se observa entre porta y cubreobjetos, teniendo precaución de escoger una gota suficientemente pequeña para que no sea deformada por la presión.

Enfocando la parte inferior de la inclusión lipídica puede apreciarse una masa grisácea muy laxa que presenta tres zonas concéntricas, una exterior muy clara, una intermedia oscura y una zona central gris (fig. 28d).

Enfocando el centro de la inclusión lipídica se aprecia este último límite como un estrecho anillo negro muy nítido, invadido por círculos de difracción. El resto de la inclusión lipídica aparece en gris claro (fig. 28e). Enfocando la parte superior aparece un círculo muy brillante y nítidamente delimitado (fig. 28f).

Estos aspectos corresponden a un resultado totalmente opuesto al obtenido en el caso de la burbuja de aire en el agua o en el bálsamo: la zona oscura disminuye en lugar de aumentar cuando se baja lentamente el objetivo para enfocar los distintos planos.

CONSECUENCIAS PRÁCTICAS

Fenómenos de refracción

Estos tres ensayos nos han permitido conocer y reconocer las burbujas de aire y de aceite para no confundirlas con elementos histológicos de origen animal o vegetal. Asimismo, nos muestran la diferencia existente entre las estructuras más refringentes o menos refringentes que el medio en el que se encuentran.

Las estructuras *más refringentes que el medio* (gotas de aceite en el agua) presentan una parte central tanto más clara y estrecha cuanto más cercanos estemos del enfoque de su *superficie superior*, rodeada por un círculo oscuro cada vez más ancho. Se comportan como si se trataran de lentes biconvexas.

Las estructuras *menos refringentes que el medio* (burbujas de aire en el agua) presentan una parte central cada vez más clara y estrecha, rodeada por un anillo oscuro, que es cada vez más ancho cuanto más nos acercamos a enfocar la *cara inferior*. El efecto es más acusado cuanto mayor sea la diferencia entre los dos índices de refracción (burbuja de aire en el agua o en el bálsamo del Canadá). Estas estructuras se comportan como si fuesen lentes biconvexas.

Inversamente, los *objetos convexos* y más refringentes que el medio actúan sobre la luz como si se tratara de inclusiones lipídicas en el agua: las *estructuras cóncavas* y menos refringentes que el medio se comportan como las burbujas de aire en el agua.

Tenemos ahí, pues, una manera de evaluar el índice de refracción de la estructura, siempre y cuando no sea miscible en el líquido en el que se observa. Preparando con antelación una serie de líquidos de índice de refracción conocido y sumergiendo en ellos, y de forma sucesiva, el material, se acaba por encontrar el líquido que tenga su mismo índice de refracción o bien colocando el material entre dos líquidos, uno de los cuales tiene un índice más elevado y el otro un índice más débil.

Este sistema, denominado de *inmersión*, es muy utilizado por los mineranólogos y por los químicos. Tal como la vamos a exponer es únicamente aplicable a las estructuras isótropas o monorrefringentes. El índice de las estructuras anisótropas o birrefringentes presenta valores distintos según la orientación: su determinación exige el empleo del microscopio de luz polarizada.

Hemos comprobado que trabajando con luz axial, las diferencias de refringencia ya son sensibles. Se acentúan considerablemente cuando se trabaja con luz oblicua, dado que entonces las bandas oscuras o luminosas son más acusadas por un lado que por otro; su posición depende también de la dirección del haz de iluminación y de la diferencia de índice de refracción entre el objeto estudiado y el líquido en el que está inmerso.

Para obtener la *iluminación oblicua* se procede de la siguiente manera: se separa el diafragma del eje óptico o, por el contrario, se abre al máximo; seguidamente, se hace deslizar bajo el condensador una cartulina cortada en línea recta o todavía más sencillo, se pone el dedo. No aconsejo la utilización de algunos sistemas de iluminación oblicua que existen en algunas subplatinas, ya que no permiten conocer con exactitud la dirección del haz de iluminación (fig. 30).

Si el material es más refringente que el medio, los rayos convergen hacia la misma dirección que los haces luminosos, mientras que si es menos refringente divergen en sentido opuesto. Dado que las imágenes que da el microscopio son invertidas, se tendrá el siguiente resultado. La sombra se extiende sobre el campo microscópico, por el lado donde se encuentra el dedo o la cartulina: se debe procurar que la mitad del campo aparezca oscura. En este caso, un material más refringente que el medio aparecerá oscuro en el lado oscuro del campo (fig. 30) e iluminado en el lado de la luz. Por el contrario, un material menos refringente que el medio será iluminado por el lado oscuro y sombreado en el lado de la luz. Una muestra que tenga la misma refringencia que el

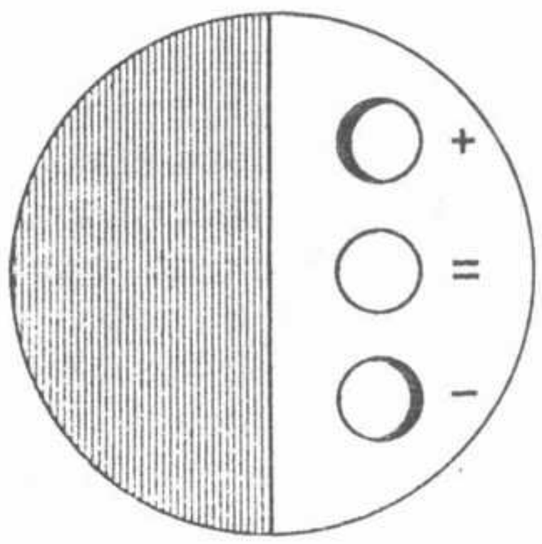


FIG. 30. — *Determinación del índice de refracción de un glóbulo por inmersión en un líquido de índice conocido y con iluminación oblicua.* El rayado oscuro desaparece por la igualdad de los índices; está al lado de la pantalla si el índice del glóbulo es más elevado que el del medio, y en posición opuesta en el caso inverso.

medio será rodeada de franjas coloreadas, dado que el líquido tiene casi siempre un poder dispersivo más grande que el material a estudiar.

Estos fenómenos no se aprecian con toda nitidez a no ser que se eleve al máximo el condensador, estando el iris totalmente abierto y si no se trabaja con un objetivo de mediano aumento (200 aumentos). Si se baja el condensador, los resultados se invierten y aparecen mucho menos nítidos.

Para obtener las escalas de líquidos de índice de refracción graduada pueden tomarse diversos materiales puros, de constante conocida, o bien mezclas artificiales (cf. tabla, p. 98).

Fenómenos de difracción

Las *franjas de difracción* pueden ser origen de una ilusión óptica y ser consideradas por el observador como auténticas estructuras. Hay diversos procedimientos para reconocer su verdadera naturaleza: todos se basan en ver si estas franjas pueden exagerarse y si se puede lograr su separación. En caso afirmativo se trata realmente de franjas de difracción. Para ello, debe cerrarse el diafragma reduciendo la sección del cono de iluminación, o bien se observa la preparación con luz monocromática amarilla. En el primer caso, las franjas aparecen bien diferenciadas y contrastadas cuanto más cerrado esté el diafragma. En el segundo caso, logrado al emplear una lámpara de sodio, o más sencillamente, intercalando alternativamente un filtro azul y después otro de rojo en el portadiafragmas, las franjas de difracción son alternativamente estrechadas o dilatadas.

Al principio de este capítulo hemos establecido una distinción fundamental entre las imágenes de *estructuras teñidas* o de amplitud producidas por fenómenos de *absorción* y las imágenes de *estructuras no teñidas* o de fase, debidas a fenómenos de *reflexión,* de *refracción* y de *difracción.* Estas últimas son, como acabamos de ver, muy complicadas y su interpretación puede ser excesivamente difícil; las zonas claras y oscuras y las franjas de difracción pueden originarse a nivel de membranas o en auténticas estrías. Es por ello que debemos evitar confundir las ilusiones ópticas con auténticas estructuras. Las imágenes obtenidas por absorción son, por el contrario, mucho más fieles y permiten visualizar mucho mejor los contornos de las estructuras. Por ello, su interpretación está menos sujeta a errores.

PRECAUCIONES A TOMAR EN UN LABORATORIO DE MICROSCOPIA

A continuación indicaremos las principales reglas a seguir para poder trabajar confortable y eficazmente:

— Es indispensable una máxima limpieza.

— Es conveniente hacerse un plan de trabajo, anotar los tiempos requeridos para cada una de las operaciones o pasos de la técnica a seguir, anotando previamente las cantidades requeridas de cada uno de los reactivos. Éstos serán preparados con antelación, a no ser que deban prepararse extemporalmente.

— Prever suficientes superficies de trabajo para efectuar todas las operaciones con el mínimo desplazamiento posible.

— Protéjase de la contaminación de los productos tóxicos poniéndose una bata que será cambiada frecuentemente; conviene trabajar con guantes de goma finos para manipular reactivos corrosivos; es conveniente lavarse las manos después de haber manipulado productos tóxicos. Algunos son motivos de alergia.

— Recuerde que determinados productos emiten gases más o menos tóxicos: ácidos volátiles, dioxano, fenoles, el cloro y sus derivados, etcétera. Trabajar bajo campana es lo mejor.

— Decante siempre el ácido sobre su eluyente y nunca al revés.

— Ponga vaselina al esmeril de los tapones y bocales a fin de abrirlos fácilmente.

— Si han quedado agarrotados utilícese el alcohol o el agua oxigenada o la mezcla de Séguy: glicerina: 5 ml + agua: 5 ml + hidrato de cloral: 10 g + ácido clorhídrico al 25 %: 5 ml; hacer entrar por permeabilidad capilar. Si se quiere calentar, hacerlo mediante corrimiento de un cordel de forma rápida, no hay que calentar por ningún otro sistema, dado que podría explotar el recipiente.

— No deje nunca un recipiente abierto ni sin etiquetar.

— Coloque bolas de vidrio en aquellos frascos cuyos reactivos tengan tendencia a oxidarse, para que el líquido quede nivelado hasta el tapón y así el volumen de aire interior será mínimo.

— No se fíe de su memoria, anótelo todo enseguida.

— Utilice únicamente una vez el papel o los recipientes que sirven para pesar o extraer los productos, a fin de evitar contaminaciones; tirarlos o lavarlos después de su empleo.

— No tire los productos tóxicos en los desagües sin haberlos neutralizado previamente.

— Tenga tantas pipetas preparadas como líquidos a trabajar. Lávelas y séquelas entre dos operaciones.

— Conserve las resinas, los medios de montaje, los colorantes y todos los reactivos en general, protegidos de la luz.

— Conserve los ácidos y productos volátiles en un sitio aparte.

— No vaya con prisas mientras está trabajando, no consienta que se le moleste.

— Si la técnica no ha dado buen resultado,

vuelva a empezar: compruebe que no haya cometido alguna falsa maniobra, la calidad de los reactivos, estado de conservación de la muestra, pero también debe pensarse que la impaciencia del operador haya estropeado el resultado de la técnica.

— Para limpiar el material de vidrio utilícese la mezcla sulfocrómica: dicromato potásico: 20 g + agua: 100 ml + ácido sulfúrico concentrado: 100 ml. Prepare este líquido en cantidad, debe sobrepasar en exceso el material de vidrio que se bañe en él, evitando que las piezas se toquen unas con otras, sobre todo debe vigilarse que los portaobjetos no queden pegados entre sí.

— Deben limpiarse los porta y cubreobjetos, incluso cuando son nuevos.

— La limpieza de los porta y cubreobjetos puede hacerse en seco con un poco de magnesia, frotándolos hasta que desaparezca cualquier adherencia de polvo.

— Para que la superficie del portaobjetos sea adhesiva, pásese rápidamente por la parte azul de la llama de un Bunsen.

— No tire nunca sus cultivos sin haberlos formolado previamente.

— El formol y el fenol tienen una tensión de vapores tal que son suficientes para esterilizar por vía gaseosa las piezas pequeñas, pero debe tomarse una precaución especial con el fenol, dado que ataca las piezas metálicas.

— Para conservar anhidros los reactivos muy higroscópicos, como el alcohol absoluto, la acetona, el dioxano, utilizar el cloruro de calcio anhidro o el sulfato de cobre anhidro o incluso mejor el carburo de calcio o el sodio metálico. Estos dos últimos reactivos son más peligrosos, el primero por desprender acetileno y el segundo porque quema en contacto con el agua.

— Para abrir frascos que contengan una resina utilícese el cloroformo o el benceno.

— Para limpiar las lentes de un objetivo o de un ocular utilícese una pera de goma y sople enérgicamente. Un papel para limpiar gafas o un pincel únicamente se emplearán si quedan motitas de polvo después de haber soplado. Las huellas de grasa, como las huellas digitales, serán eliminadas con alcohol y no con un hidrocarburo. Nunca debe sumergirse un sistema óptico en un líquido de limpieza, sea de la índole que fuere: se arriesga a desprender las lentes.

— El ácido fluorhídrico gaseoso ataca las lentes, deslustrándolas. Este reactivo, en caso de usarse para otras cuestiones, debe hacerse en pleno aire.

— El ácido acético permite destapar fácilmente las agujas obstruidas y despegar las jeringas agarrotadas. Se introduce el ácido acético en las jeringas con una pipeta fina y en las agujas con una cerda. Seguidamente, lavar abundantemente y poner un poco de aceite.

W. R. Goff aconseja dar a las *jeringas agarrotadas* un baño de 30 minutos en glicerina hirviendo.

VARIACIÓN DE LA INTENSIDAD LUMÍNICA

Frecuentemente debe regularse la intensidad lumínica cuando se trabaja en microscopia, bien sea para que el ojo trabaje con mayor comodidad, o bien para efectuar mediciones fotométricas en fotomicrografía o en espectrocolorimetría. Hay ocho métodos prácticos para llevar a cabo esta regulación:

1. Atenuación trabajando con luz polarizada, girando simplemente el polarizador.
2. Diafragmas giratorios, o utilizar filtros de persiana.
3. Disco gris neutro de densidad variable, lineal o giratorio.
4. Soluciones absorbentes.
5. Ley de Lambert.
6. Variando el amperaje de la lámpara.
7. Variación de la abertura.
8. Variación con ayuda de un dispositivo focal variable.

Según el uso que quiera hacerse, estos métodos no son intercambiables; así, por ejemplo:

— la atenuación de la luz polarizándola no es conveniente en el caso de que el material a observar sea birrefringente;

— los diafragmas giratorios modulan la luz en el tiempo; no pueden ser utilizados con amplificadores de corriente continua. Los filtros de persiana modifican la abertura numérica;

— las cuñas grises neutras son, sin lugar a dudas, las mejores, pero en ocasiones resultan difíciles de hacer. Si se han obtenido fotográficamente el grano de la emulsión puede llegar a molestar; se obtienen por superposición de gelatinas cargadas con tinta china, no son fácilmente continuas; se obtienen por depósitos bajo el vacío de un metal; deben desecharse, dado que producen reflejos parásitos que interfieren con nuestra observación;

— las soluciones absorbentes son muy buenas, pero los equipos modernos generalmente no prevén el sitio donde pueda colocarse cómodamente la microcubeta de caras paralelas sobre el haz lumínico;

— la ley de Lambert señala que la absorción de una solución es proporcional a su concentración. Deben hacerse las mismas consideraciones;

— la variación eléctrica provoca una considerable variación de la temperatura de color;

— la variación de la abertura no puede hacerse sin conducir a una variación del poder de resolución del sistema óptico y del contraste. Por todo ello, no es aconsejable en ningún caso;

— los filtros fotosensibles que se oscurecen

automáticamente cuando la luz incide en ellos son muy aconsejables;

— nos queda por indicar un único método óptico correcto en todos los casos: el de la variación «zoom» de los aumentos, unida a la abertura por un sistema de variación continua focal. ¡Casi ningún constructor la utiliza!

Por todo ello, vemos que el observador se halla siempre frente a soluciones de compromiso, más o menos satisfactorias. En la práctica, generalmente usa una de las menos recomendadas: la variación de la alimentación eléctrica, es decir, el amperaje.

Esperemos que en un futuro próximo los constructores de microscopios incorporen a sus aparatos variadores eficaces sin que provoquen desequilibrios cromáticos.

MÉTODOS FUNDAMENTALES DE ILUMINACIÓN EN CAMPO CLARO

Sólo hay tres sistemas, aunque en la práctica únicamente se usa uno de ellos:

1. Iluminación crítica de Dujardin.
2. Iluminación con dobles diafragmas de Köhler, el más frecuente.
3. La iluminación bifocal de Locquin.

Si otros sistemas son por azar mencionados en los textos se tratará sin duda de variaciones de cualquiera de estos métodos o, por el contrario, serán ilógicos y por consiguiente desaconsejables. Insistiremos sobre este tema más adelante.

La iluminación crítica. — Dujardin, el inventor del condensador o concentrador, como se denominaba inicialmente, nombre que en francés tiene prioridad histórica y que ocasionalmente adoptaremos, se había dado cuenta de que la calidad y la luminosidad de las imágenes eran claramente mejoradas cuando su concentrador proyectaba la imagen del foco lumínico que utilizaba en el plano del objeto a estudiar. A este método lo denominó «iluminación crítica». Cuando aparecieron las lámparas de filamento espiralado los microscopistas empezaron a rechazar este sistema de iluminación, por la serie de inconvenientes que presentaba. La proyección del filamento sobre la imagen a observar es sumamente molesta y creaba irregularidades de iluminación, todavía más molestas. Otro inconveniente: la imposibilidad de limitar el campo de iluminación al campo de observación. Sin embargo, debemos señalar que la iluminación crítica tiene un gran interés para la observación de objetos de gran superficie, dado que es el único sistema que da una auténtica iluminación incoherente a cualquiera de los aumentos en que se trabaje. Un constructor podría hacerlo eligiendo un foco puntual como pueda ser una lámpara de arco concentrada de circonio. En este caso la imagen del foco circular sería proyectada en dirección del condensador del microscopio a través de un dispositivo de distancia focal variable (zoom). El diafragma del condensador mantendría su función habitual de regulación de la abertura. El microscopista puede también hacerlo de una forma original que da excelentes resultados: se coge un portaobjetos recubierto por una capa de vidrio opal delgado y plano. Se somete directamente el material sobre esta cara opal. La preparación es iluminada por un sistema de doble diafragmas corrientes, regulando el diafragma de campo del sistema iluminador, de manera que limite la iluminación del vidrio opal en el campo de visión. El diafragma de abertura del condensador pierde entonces su función de regulador de la abertura para convertirse en un diafragma de regulación de la abertura, para transformarse en un diafragma de regulación de la intensidad del flujo incidente. Este sistema de iluminación totalmente incoherente es muy superior a otros: es el único que permite una iluminación permanente del objetivo con el diafragma totalmente abierto, sin que haya luz parásita que moleste la observación. Debe, sin embargo, tomarse una precaución: la cara en vidrio opal debe estar directamente en contacto con el objeto y debe ser extraordinariamente delgado. Los que han probado alguna vez este sistema de iluminación lo escogen prescindiendo de las restantes, sobre todo para la observación de estructuras de gran superficie: las imágenes aparecen simultáneamente suaves y contrastadas, sin franjas de difracción en los bordes de las estructuras.

En el comercio se encuentran fácilmente vidrios opales por una cara. Basta con tallarlos con un diamante de manera que adopten las dimensiones de una lámpara portaobjetos.

La iluminación con doble diafragma. — Köhler, a fin de evitar toda una serie de inconvenientes que tienen los otros sistemas de iluminación y poder utilizar lámparas de filamento espiralado, propone un método nuevo que lleva su nombre y que actualmente es universalmente utilizado. Incluso podríamos decir que todo microscopio que trabaja a más de 30 aumentos debería utilizarlo. Su iluminación comporta dos diafragmas: un diafragma denominado de campo, situado generalmente a nivel de la lámpara colectora y un diafragma llamado de abertura, situado generalmente debajo del condensador (fig. 31).

En la práctica, la imagen del diafragma de campo es proyectada en el plano de la preparación por el condensador, el cual se desplazará verticalmente hasta conseguir una imagen lo más nítida posible del diafragma. El diafragma de campo sirve para regular la abertura de la iluminación, es decir, el contraste, la profundidad de campo y el poder de resolución; recordemos que

Plano de proyección en el que se encuentra una imagen del objeto y del diafragma de campo, retina del ojo, pantalla de proyección o emulsión fotográfica.

Pupila de salida del microscopio con la imagen del diafragma de abertura y del filamento de la lámpara.

Ocular

Imagen intermediaria del objeto y del diafragma de campo.

Plano focal detrás del objetivo con la imagen del diafragma y del filamento de la lámpara. (Plano de la imagen de interferencia.)

Objetivo

Objeto observado en el plano de la imagen del diafragma de campo

Condensador

Pupila de entrada del microscopio en el plano focal anterior del condensador, diafragma de abertura e imagen del filamento de la lámpara dilatada en el sentido vertical

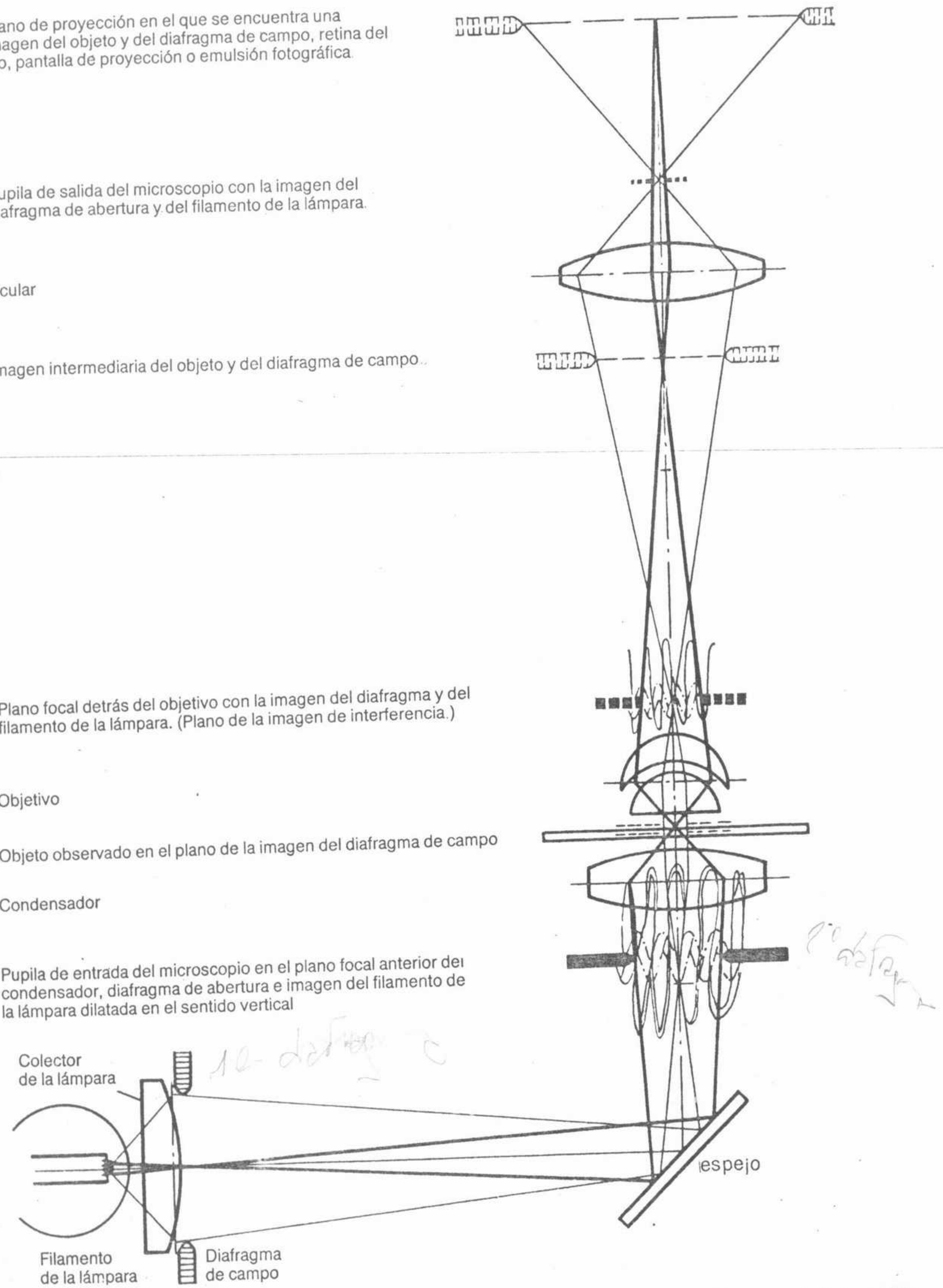


FIG. 31. — *Principio de la iluminación con doble diafragma.* Se observará que la imagen del filamento de la bombilla se encuentra axialmente dilatado en los dos niveles que aparecen en la figura; esto explica las dificultades que en ocasiones se tiene al efectuar una iluminación homogénea del campo, principalmente con los objetivos de pocos aumentos.

estas tres variables no son independientes: cerrando este diafragma se incrementan los contrastes y la profundidad de campo, pero disminuye el poder de resolución. Es imprescindible asegurar que el filamento de la lámpara esté bien centrado con relación al condensador de la lámpara, que el haz esté bien dirigido por el espejo hacia la cara de entrada del condensador y que éste esté bien centrado.

Constatamos consternadamente que en la mayoría de los microscopios, es por construcción el mismo sistema óptico de concentración el utilizado, sean cuales fueren los aumentos del objetivo; únicamente en algunos modelos hay una lente frontal movible o abatible en la parte superior de la lente frontal del condensador. A grandes aumentos, sólo se utiliza una pequeña parte del flujo lumínico de la lámpara, dado que el diafragma de campo está prácticamente cerrado, mientras que a bajos aumentos se produce el fenómeno inverso. Es a grandes aumentos cuando requerimos una gran luminosidad. Por ello, es posible y desde hace tiempo la casa Zeiss y la Officine Galileo han dotado a algunos modelos de microscopios con una lámpara colectora de distancia focal variable (zoom) colocada delante del diafragma de campo. Con ello se obtiene un mejor rendimiento y, si el dispositivo está bien diseñado, se consigue una iluminación casi constante de la imagen cuando se cambia de objetivo. Deseamos una generalización de este sistema de iluminación que vemos en los grandes estativos modernos de investigación.

La iluminación bifocal. — En la iluminación bifocal es el sistema óptico del condensador que tiene un doble foco: foco de la lente de gran distancia focal para los objetivos de pequeño aumento y foco en el espejo de corta longitud focal y gran abertura para los objetivos de gran aumento. El condensador posee un sistema de cremallera que permite desplazarlo verticalmente entre los dos focos. El observador desplaza hacia arriba el condensador hasta obtener la mejor imagen. Esta imagen tiene características particulares, ya que se obtiene superponiendo constantemente las dos iluminaciones: una iluminación fina y axial, intensa, que da los contrastes a la imagen y una iluminación suave anchamente abierta que da el poder de resolución al sistema. Resulta una imagen compuesta, pero armónicamente fusionada, que no puede ser igualada por ningún otro sistema de iluminación. Cuanto más acromático sea el sistema óptico en el foco del espejo, más fácil resulta asegurar que la imagen del diafragma de campo de la lámpara tenga a grandes aumentos una perfecta calidad.

Regulación del diafragma de abertura. — La regulación del diafragma de campo no presenta dificultades particulares: una vez correctamente enfocado en el plano del objeto, basta con abrir lo suficiente para que quede iluminado todo el campo observado, modificando, si es necesario, la posición en altura del condensador cuando se cambia de objetivo, a fin de compensar su curvatura de campo. Las cosas no son tan sencillas con el diafragma de abertura. En principio su imagen no es accesible al ojo de forma directa, es decir, hay que sacar un ocular y mirar en el fondo del tubo, o bien introducir una lente auxiliar de enfoque en el sitio donde hay el ocular y regularla como cuando se centra el diafragma del contraste de fases o bien, en el caso de que el microscopio posea una lente de Bertrand colocarla en el tubo ocular para poder efectuar la observación conoscópica. Seguidamente hay que eliminar un reflejo, molesto, que hace utilizar instintivamente el diafragma de abertura para regular la intensidad lumínica cuando ésta no es la adecuada. Generalmente debe regularse el diafragma de abertura, de tal manera que al observar ilumine entre la mitad y los dos tercios del diámetro de la lente posterior del objetivo, sacando el ocular.

Cuando los constructores hayan generalizado los sistemas de iluminación de distancia focal variable y suprimido los reguladores de voltaje en los sistemas de alimentación de las lámparas, los usuarios podrán pasarse de estos instrumentos fotomicrográficos costosos, ya que la fotomicrografía podrá casi siempre hacerse con un tiempo de exposición constante, y únicamente habrá un solo filtro corrector de la temperatura de color a nivel del estativo. Habrán terminado los tanteos y los automatismos fotográficos. Un microscopio bien concebido y bien regulado trabaja con una iluminación constante de la imagen y ésta es suficiente para asegurar en casi todas las condiciones en campo claro y luz blanca un tiempo de exposición del orden de una centésima de segundo al trabajar con una emulsión de 10-20 ASA. Bastará que el observador haga una corrección en función del filtro de color y de la relativa opacidad del objeto. Si se desea un automatismo debería llevar sobre la compensación de estos dos factores el tiempo de exposición que se mantenga constante; un vidrio fotosensible asegurará muy bien esta función.

DIAGNÓSTICO SISTEMÁTICO DE LAS CAUSAS DE UNA MALA IMAGEN

1. Verificar que la iluminación esté bien hecha, tomando como referencia todo lo señalado en el capítulo de la «iluminación» de este manual.
2. Verificar la limpieza de la superficie frontal de las lentes del objetivo con una lupa o con un ocular invertido.

3. Comprobar que no haya ningún filtro difusor entre el diafragma de campo y el de abertura.
4. Verificar el correcto centrado del revólver portaobjetivos.
5. Comprobar la limpieza del portaobjetos y del cubreobjetos; comprobar que el portaobjetos esté en posición correcta y que únicamente haya un solo cubreobjetos y no dos superpuestos.
6. Verificar la limpieza de todo el sistema óptico, procediendo de la siguiente manera: hacer girar sobre sí mismo un ocular primero y luego el otro contemplando cómo evolucionan las motitas; si se mueven podemos afirmar que están a nivel del ocular y deberá procederse a limpiarlos. Hacer girar el tubo binocular en su conjunto. Nunca debe desmontarse el tubo ocular, pero sí pueden limpiarse delicadamente las lentes, soplando con una pera las superficies accesibles de entrada y salida de los prismas.

Hacer girar, desviándolo ligeramente, el objetivo; si las imágenes parásitas giran, al desenroscarlo ligeramente, deberá procederse a limpiarlo; con la ayuda de un pincel seco puede intentarse sacar el polvo.

7. Verificar que el aceite de inmersión sea suficiente, que no contenga burbujas ni impurezas y que no sea fluorescente.
8. Comprobar que el objetivo esté bien enroscado.
9. Verificar el grosor del cubreobjetos, portaobjetos y medio de montaje. Si este conjunto fuera demasiado grueso puede impedir cualquier enfoque a medianos y grandes aumentos. La imagen es de calidad mediocre si nos alejamos mucho del grosor estándar (fig. 32). ¡Cuidado con poner dos cubreobjetos superpuestos en el momento de efectuar el montaje!
10. Comprobar que la montura del condensador esté bien centrada y la frontal bien retenida en el caso de ser abatible. Verificar que su crema-llera esté suficientemente apretada para que se pueda mantener en posición correcta.
11. Comprobar que la intensidad lumínica sea la correcta, ni demasiado débil ni excesiva. No regularla nunca con el diafragma del condensador.
12. Comprobar que no usamos objetivos de contraste de fases para hacer observaciones en campo claro cuando se trabaja a grandes aumentos.
13. Comprobar que el filamento de la lámpara esté bien centrado con relación a su colector.
14. Si el microscopio funciona con espejo, comprobar que esté colocada la capa plana del mismo y que sea ésta la que proyecte el haz luminoso sobre el diafragma del condensador.
15. Si el condensador tiene la lente frontal abatible, debe comprobarse que esté bien colocada.
16. Comprobar que no utilicemos una combinación incorrecta entre el ocular y el objetivo, puede darse el caso de que el ocular utilizado sea demasiado potente.
17. La preparación puede no ser correcta, debe compararse con una preparación test.
18. Si la mala calidad aparece únicamente sobre las fotografías, ello puede ser debido a haber escogido una combinación óptica insuficientemente corregida o por haber escogido unos filtros de contraste no adecuados.
19. Si se trabaja con contraste de fases el error más frecuente es el del centrado poco correcto del anillo de iluminación. A la vez que puede descentrarse, recordémoslo, debido a la geometría de las estructuras.
20. Si se trabaja con fluorescencia y se aprecian fluorescencias parásitas pueden proceder del medio de montaje, del aceite de inmersión, de la óptica inadecuada o del uso de un filtro incapaz de cortar los rayos de excitación.
21. Si se trabaja con luz polarizada, después de haber comprobado cuidadosamente el reglaje de los nícoles, una ligera despolarización o un incorrecto fondo negro entre los nícoles cruzados pueden producir: polvos difusores, tensiones accidentales en la óptica debidos a un choque o a variaciones térmicas, alteraciones diversas sobre los polarizadores.
22. El campo oscuro, al igual que el contraste de fases negativo es particularmente sensible al polvo, a las burbujas del medio de montaje o de inmersión, a la superposición de estructuras en la preparación.
23. Si se escoge un medio de montaje con un índice de refracción demasiado parecido al del objeto incoloro, éste no será visible, ni siquiera con el contraste de fases o contraste interferencial.
24. Si hay una neblina únicamente en los bordes del campo significa que hay una mala correc-

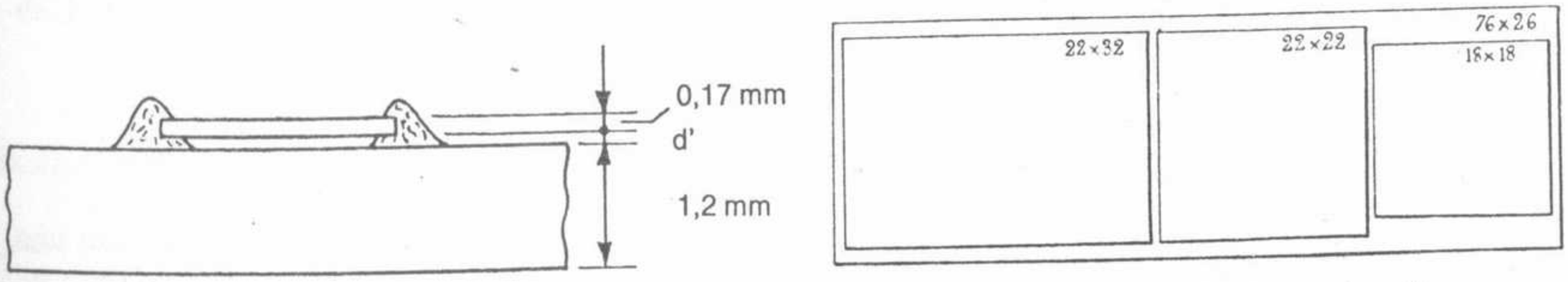


FIG. 32. — *Estandarización de las dimensiones de las láminas portaobjetos y de las láminas cubreobjetos.*

ción de esfericidad del campo por parte del sistema óptico.

25. Si aparece un trazo oscuro sobre la imagen, puede deberse a un debilitamiento de las espiras del filamento de la lámpara, o a la rotura de una de las lentes del colector de la lámpara.

26. *Oscuridad del campo.* — Se debe a un incorrecto centrado del sistema de iluminación. Verificar la posición del espejo, la altura del condensador, la posición del diafragma iris que puede estar demasiado cerrado o descentrado, sobre todo en las monturas que permiten la iluminación oblicua. Véanse las reglas referentes a la iluminación del microscopio.

27. Una *oscuridad parcial* del campo de observación puede deberse al revólver, que no ha quedado bien encajado el objetivo escogido. Se aprecia que el objetivo está bien centrado cuando se nota una cierta resistencia.

28. **Desplazamiento de la imagen cuando se varía el enfoque.** — Aparte de una defectuosidad del microscopio como consecuencia de un centraje defectuoso o de un juego anormal en el movimiento micrométrico, este inconveniente es generalmente debido a una iluminación oblicua. Se soluciona rectificando la posición del espejo, de manera que pueda obtenerse una iluminación axial, como se ha explicado anteriormente.

29. **Desigualdades en la iluminación.** — El desenfoque de la iluminación puede proceder del mismo aparato: fallo de centrado, polvo o manchas sobre el espejo y las lentes del condensador. Puede ser causado por agentes exteriores: barras de ventanas, objetos interpuestos accidentalmente en la trayectoria de los rayos lumínicos.

En ambos casos, nos aseguramos que este desenfoque sea debido a uno u otro motivo, desplazando ligeramente el condensador, mediante la cremallera: enseguida vemos cómo mejora la iluminación y podemos reconocer de dónde procede el mal.

Cuando el cono luminoso dado por el condensador es demasiado ancho, es decir, cuando el diafragma iris está demasiado abierto, los detalles del objeto, sobre todo cuando no está coloreado, se ven amortiguados por el exceso de luz y llegan incluso a desaparecer. Este fenómeno ocurre porque los rayos llegan directamente al ojo del observador, sin atravesar el objeto, como consecuencia de las reflexiones ocurridas sobre el portaobjetos, el cubreobjetos, sobre las burbujas de aire que pueda tener la preparación, la montura del objetivo, las paredes del tubo, etc. Estos diversos reflejos alteran más o menos la nitidez de la imagen. Se soluciona con facilidad al iluminar correctamente y, ante todo, cerrando el diafragma de campo, y después el de abertura, hasta que la imagen aparezca con toda nitidez.

30. **Desenfoques subjetivos.** — Son debidos a lo que llamamos «moscas volantes». Se trata de imágenes de corpúsculos incoloros, redondeados, en rosario o en forma de filamentos, que parecen desplazarse en el campo del microscopio. Con un poco de costumbre, desplazando ligeramente la preparación o modificando el enfoque, vemos cómo estas formaciones son independientes del objeto examinado y del microscopio. Generalmente se trata de restos celulares que flotan en el cuerpo vítreo y proyectan su sombra en la retina. Las imágenes que ofrecen se originan pues en el propio ojo del observador, en ocasiones son extremadamente molestas: hasta el momento no hay ningún sistema para eliminarlas que no sea descansando un rato el ojo.

31. **Corrientes y movimientos brownianos.** — Las corrientes se dan generalmente en aquellas preparaciones que no están montadas definitivamente. Se deben a la posición inclinada de la platina o bien a una desecación progresiva del medio de montaje, o bien por haber añadido líquidos en los bordes del cubreobjetos. Son particularmente molestos en los estudios de sangre fresca. Se soluciona parcialmente el problema cementando las preparaciones y procurando hacerlas lo más delgadas posible, efectivamente, cuanto menos líquido haya menos corrientes se formarán.

El movimiento browniano o movimiento molecular es una especie de trepidación que agita sin cesar los corpúsculos minúsculos presentes en la mayor parte de los líquidos. No se los debe confundir con las bacterias, las cuales tienen también movimientos muy activos. Esta diferenciación no siempre resulta fácil y requiere una minuciosa atención.

III. — PRINCIPALES MÉTODOS INSTRUMENTALES

OBSERVACIONES EN CAMPO OSCURO

Existen distintos métodos para observar un objeto sobre un fondo oscuro, es decir, utilizando únicamente la luz difractada por él:

— observación incidente (o por reflexión), con iluminación oblicua o anular;

— observación por transmisión, con una pantalla central o anular en el objetivo para parar la luz directa, del orden 0 (fondo negro central);

— observación por transmisión, con una iluminación anular de abertura numérica superior a la del objetivo (fondo negro anular);
— observación de un objeto birrefringente entre nícoles cruzados (polarización).
— observación perpendicular a la dirección del haz de iluminación (fondo negro ultramicroscópico).

La observación por reflexión con iluminación oblicua o anular es la más frecuentemente utilizada con los microscopios estereoscópicos o lupas binoculares. Generalmente no nos damos cuenta de que observamos en fondo oscuro cuando el material ocupa todo el campo visual.

La observación por transmisión con una pantalla central necesita la utilización de un objetivo con pantalla interna de Spierer; con una pantalla anular, la de Wilska: anoptral, versión original y no la fabricada industrialmente que es un contraste de fase negativa a fuerte absorción.

La observación por transmisión, con una iluminación anular de abertura superior a la del objetivo, es la única que, en la práctica corriente, se denomina campo oscuro. Debe indicarse que difícilmente pueden utilizarse objetivos de gran aumento, de abertura numérica superior a 1,0, dado que el condensador debe tener siempre una abertura superior a ésta. Debe entonces practicarse la inmersión, evitando las burbujas de aire, lo cual no siempre es fácil (figs. 33 y 34).

La observación de un objeto birrefringente entre nícoles cruzados da una imagen sobre fondo negro de naturaleza muy particular (cf. pág. 45).

La observación con un haz perpendicular a la dirección de la observación según Ziedentopf y Szigmondy da informaciones sobre la orientación de las partículas observadas.

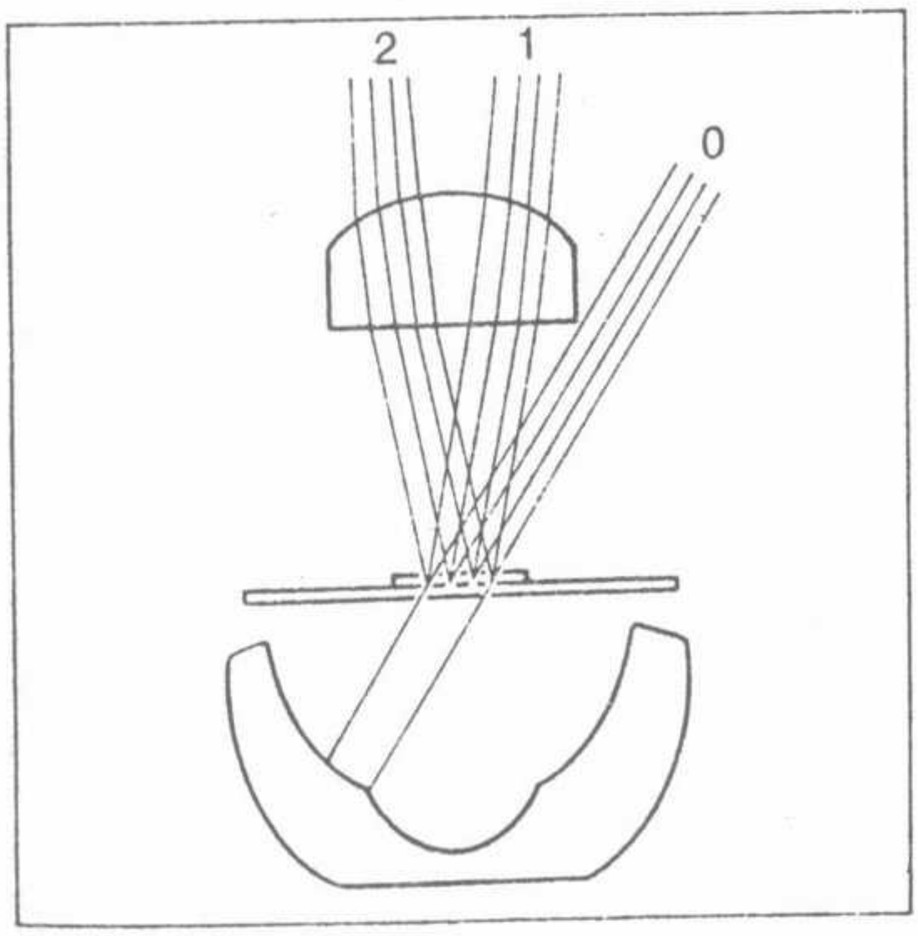


FIG. 33. — *Difracción en campo oscuro.* Tras la iluminación oblicua, el haz directo ya no entra en el objetivo, únicamente intervienen los haces difractados en la formación de la imagen.

Naturaleza y estructura de la imagen en fondo oscuro. — Las imágenes en auténtico fondo negro son remarcables por un efecto de borde, con numerosas franjas de difracción muy brillantes si el objeto es refringente. Los planos, en el centro de una estructura parecen ópticamente vacíos. Es por ello que deben tomarse grandes precauciones en el momento de interpretar las imágenes. Dado que la imagen se forma únicamente con la luz difractada, siempre más débil que la luz directa, deben usarse fuentes lumínicas muy intensas, lo que no siempre es fácil sobre todo cuando los objetos son vivos y, por consiguiente, sensibles a fuertes iluminaciones (fig. 35).

OBSERVACIÓN CON LUZ REFLEJADA

Los microscopistas siempre han intentado observar al microscopio cuerpos opacos, tales como los cristales u organismos enteros, pero debían iluminarse por reflexión dado que no son transparentes. Cuando se trabaja a pequeños aumentos basta con colocar adecuadamente una lente, pero para grandes aumentos ha tenido que diseñarse otro dispositivo. Leeuwenhoek, a partir de 1668, adaptó a sus lentes un reflector cóncavo de cobre pulido, y en 1740 Lieberkühn ideó el espejo que lleva su nombre. Inicialmente, era un espejo cóncavo de plata pulimentada, después un vidrio plateado, cuyo foco era el mismo que el del objetivo al que iba destinado y que estaba fijado a su montura. Es decir, se necesitaban tantos espejos como objetivos. Este aparato, iluminado de abajo hacia arriba por los rayos reflejados mediante el espejo del microscopio, daba excelentes resultados y no comprendemos por qué ha caído en el olvido. El trabajar preferentemente con cortes y con preparaciones transparentes, más fáciles de observar que de interpretar, es una de las causas por las que ya no se usa y del empleo casi exclusivo de la microscopia de la luz transmitida.

El espejo de Lieberkühn ha sido pues sustituido por los *iluminadores incidentes,* denominados también *iluminadores opacos*, que permiten examinar objetos opacos con luz reflejada, aun con los potentes objetivos de escasa distancia frontal. En estos aparatos, la iluminación se consigue por medio de un prisma de reflexión total o con un espejo semirreflejante situado encima de las lentes e iluminado lateralmente con un dispositivo apropiado. Estos instrumentos son muy utilizados en metalografía; sin embargo, no convienen para el estudio de superficies pulimentadas dado que sobre los objetos irregulares se producen reflejos muy molestos. Por ello, el iluminador opaco ha sido poco utilizado en biología (fig. 36).

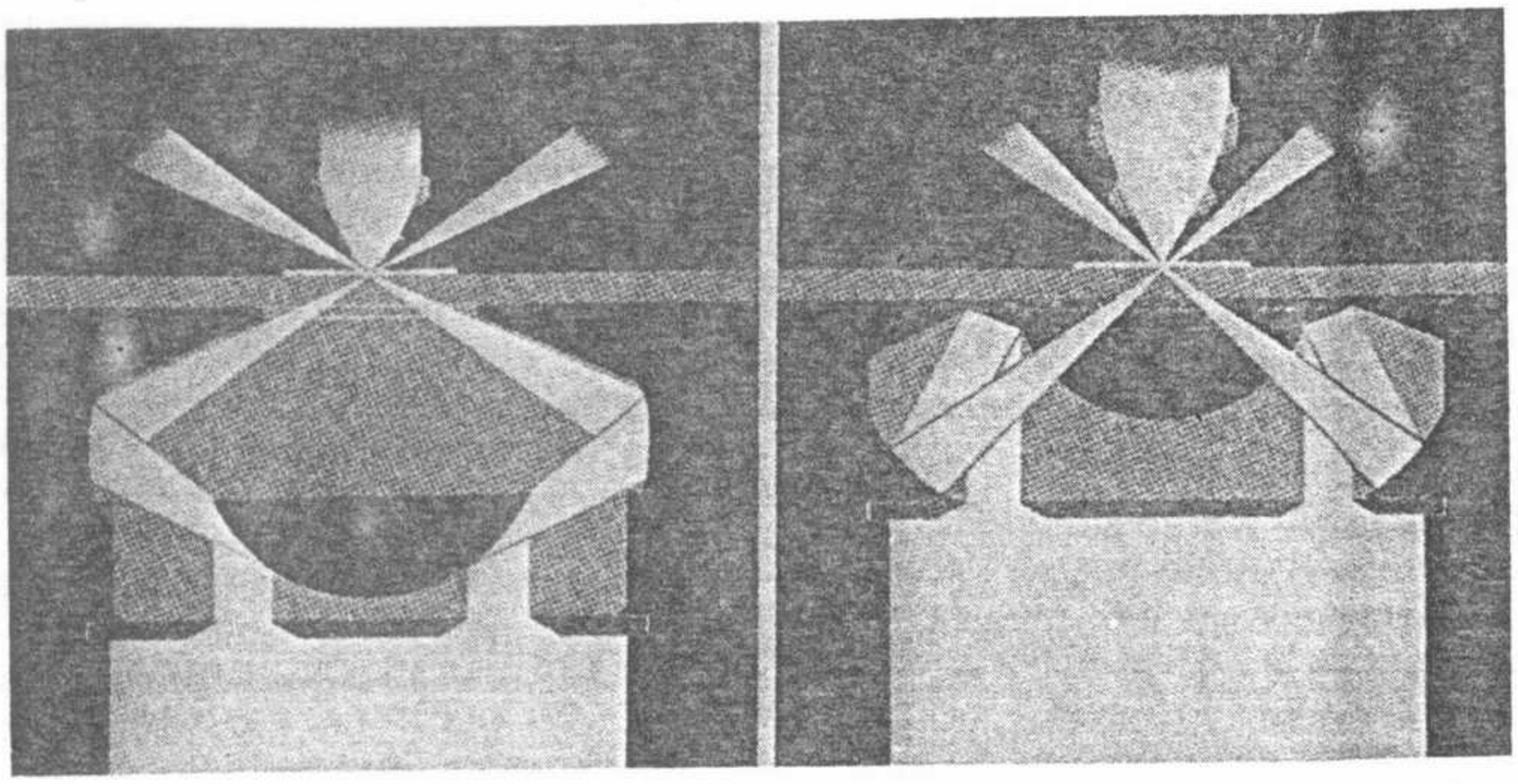
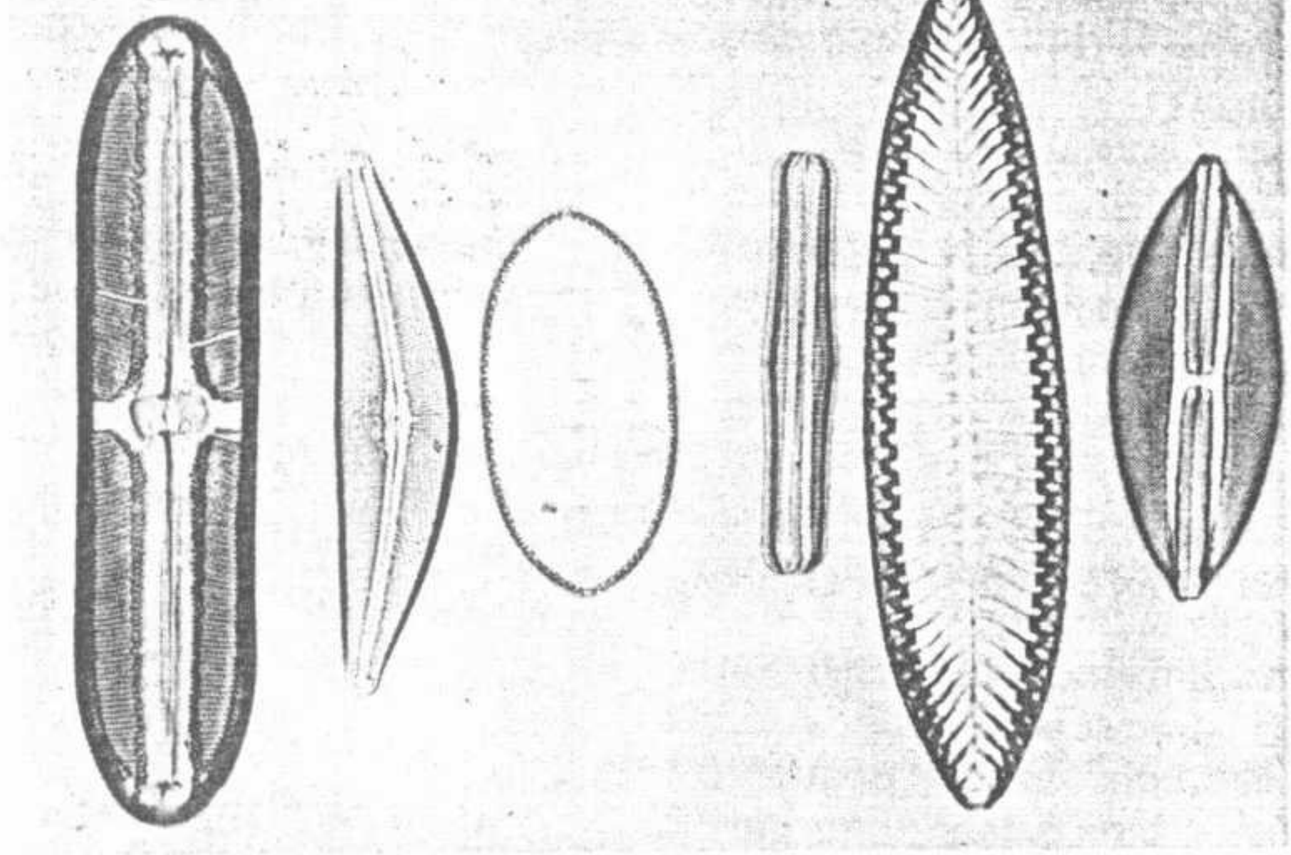


FIG. 34. — *Dos tipos de condensadores de campo oscuro, con inmersión de la lente frontal a la izquierda y sin inmersión en el de la derecha.*



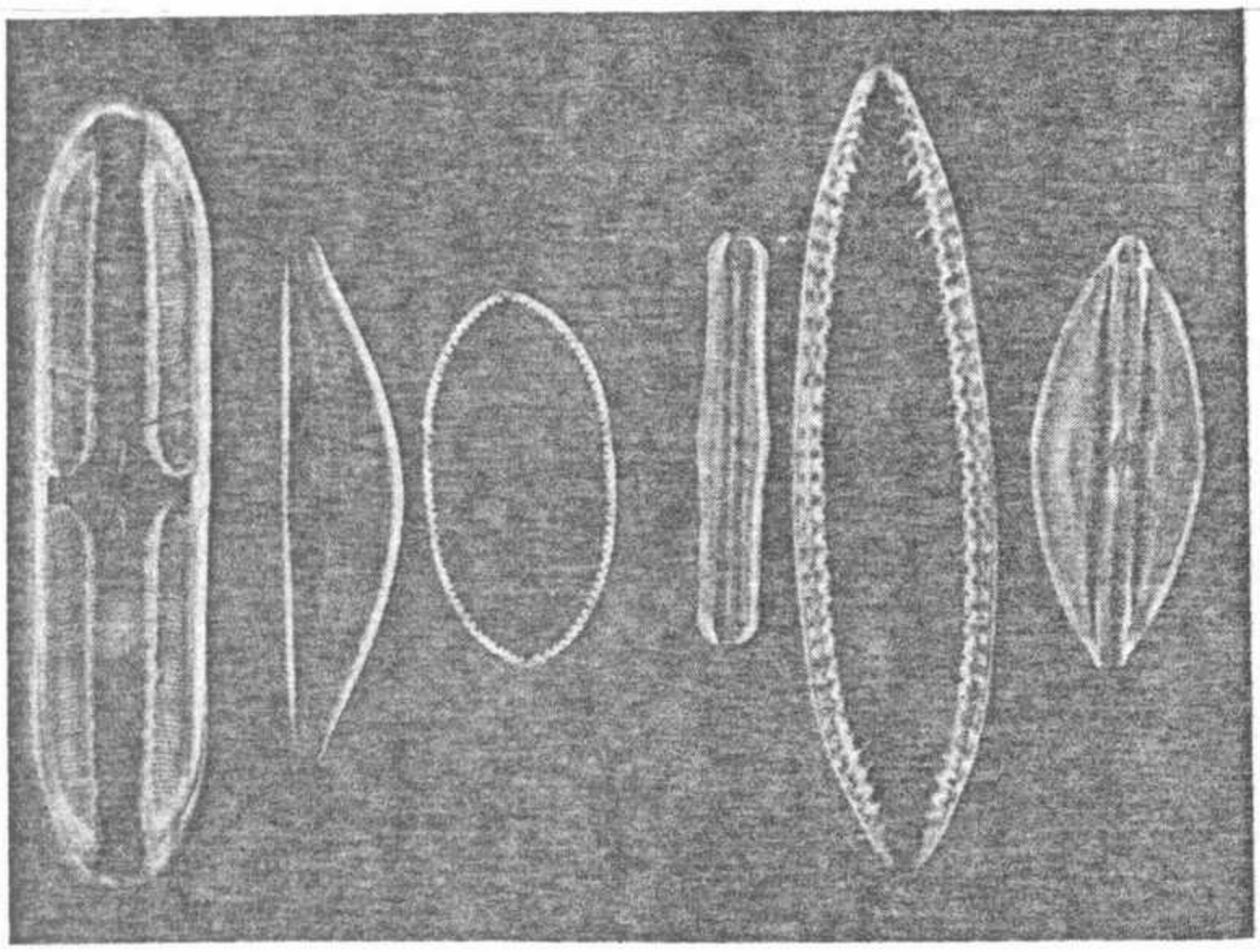


FIG. 35. — *Imágenes de campo claro y oscuro de la misma serie de diatomeas.* Documento Leitz-Wetzlar.

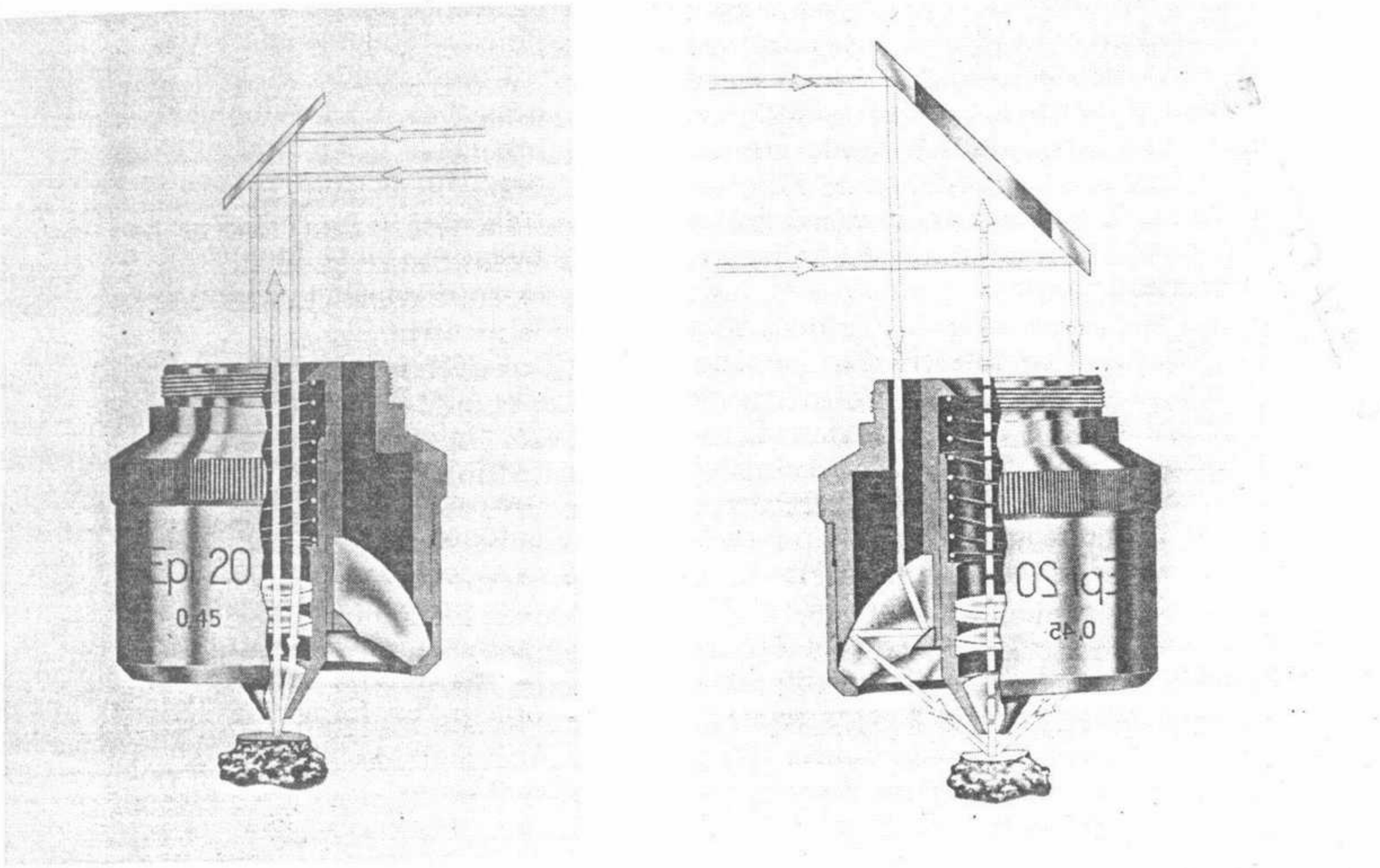


FIG. 36. — *A la izquierda, iluminación del objeto opaco a través del objetivo; alrededor del objetivo, a derecha, con la ayuda del mismo objetivo portador de un condensador anular epiobjetivo.* Documento Wild-Heerbrugg.

Ultropak. — La observación con luz reflejada ocupa actualmente en biología el lugar que le corresponde, entre los métodos más utilizados para la observación vital. Efectivamente, la casa Leitz ha adoptado, mejorándolo considerablemente, el espejo de Lieberkühn, es decir, la *iluminación anular, alrededor del objetivo* y no a través de él, como en el caso del iluminador opaco. En estos instrumentos la iluminación anular periférica está asegurada por la utilización de un condensador anular con lentes o con un espejo (fig. 36).

Leitz ha creado una serie de 15 objetivos, cuyos aumentos van de 3,8 a 100, provisto cada uno de ellos de un condensador anular, con lentes o con espejo, de la misma distancia focal que el objetivo. Hay seis objetivos de seco (3,8, 5, 6,5, 11, 22, 50); cuatro de inmersión en agua (23, 55, 70, 90) y cinco de inmersión en aceite (11, 23, 60, 75, 100). La iluminación se produce lateralmente mediante una pequeña lámpara incandescente, cuya luz se dirige mediante un pequeño condensador sobre las superficies reflejantes que iluminan las lentes o los espejos anulares.

Los objetivos están corregidos para una longitud de tubo de 185 mm, a fin de compensar el alargamiento producido sobre el tubo normal (170 mm) por la altura del *aparato Ultropak*. Tienen una gran distancia frontal, de manera que es posible observar los materiales, capa por capa, en profundidad. Las lentes frontales se alargan, pero su extremo está protegido para evitar la penetración de rayos que no sirvan para la formación de la imagen. La abertura numérica de la lente frontal corresponde exactamente a la abertura numérica del objetivo y a la superficie del campo óptico.

Estos objetivos en principio deben usarse para observar preparaciones sin cubreobjetos, sobre todo cuando se trabaja con objetivos potentes, por ejemplo con el 50×, pudiéndose emplear cubreobjetos con los objetivos más débiles, las inmersiones en agua y sobre todo las inmersiones homogéneas. Estos objetivos pueden también

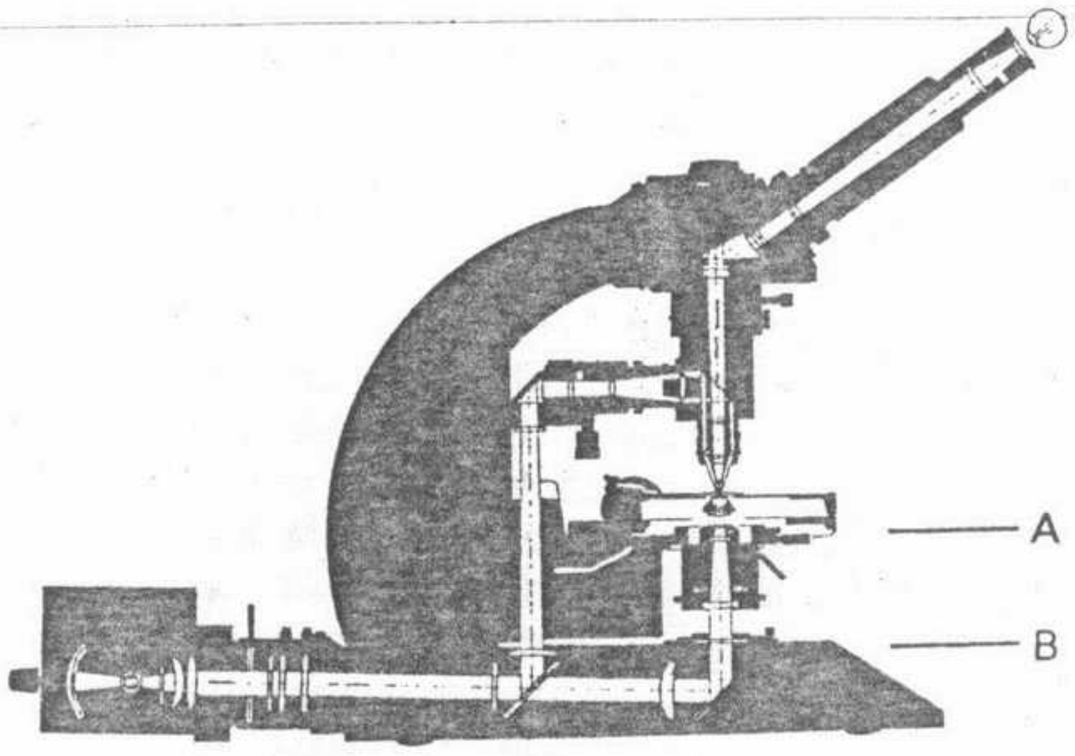


FIG. 37. — *Microscopio de investigación Zetopan.* Corte con la trayectoria de los rayos lumínicos en luz transmitida y con luz incidente anular. B, plano del diafragma de campo; A, plano del diafragma de abertura. Documento Reichert Wien.

servir para observaciones con luz transmitida o con luz reflejada. Los objetivos de poco aumento tienen un condensador anular, los de mayor aumento tienen un condensador de espejo. Estos diversos condensadores pueden centrarse mediante un dispositivo especial; de esta manera, puede regularse la iluminación atendiendo al tipo de objetos; la posición intermedia se ha indicado con una marca roja.

Los objetivos pueden tener diafragmas, lo que aumenta su poder de penetración: hay una serie de 6 diafragmas, en los que el diámetro es, respectivamente, de 5, 4, 3, 2,5, 2 y 1,5 mm. La elección del diafragma depende de la naturaleza del objeto: un diafragma demasiado estrecho debilita la resolución. Se emplean con o sin tubo especial: por ejemplo los números 3,8× y 11× de inmersión homogénea se emplean sin tubo; el de 11× a seco con el tubo 11×T, el 22 con el tubo 22T, etc. Un diafragma tiene sectores, van de 90 a 180°; permiten obtener algunos efectos especiales de iluminación; se hacen deslizar por la ranura que sirve también para colocar los diversos filtros y determinadas pantallas.

Dispositivos de inmersión. — Se utilizan estos dispositivos para el examen de los objetos mojados con agua, mucosidades o grasa (órganos, venenos, etc.): estos objetos tienen también una superficie irregular que produce reflejos molestos. La utilización de un cubreobjetos es insuficiente, sobre todo cuando se trata de objetivos de pequeño aumento, debido a las reflexiones que se producen sobre el cubreobjetos o sobre las irregularidades de la superficie. Los dispositivos de inmersión tienen la forma de un cono más o menos alargado: su superficie frontal puede tocar el líquido que se halla en la superficie del objeto; la superficie superior está situada bastante alta para que no penetre ninguna luz parásita. Estos aparatos son independientes de la iluminación anular y pueden enfocarse atendiendo la naturaleza del objeto y puede servir para aplanarlo. Pueden sumergirse más o menos en el agua o en otro líquido. Los objetivos números 3,8×, 5×, 6,5×, 11× pueden pues emplearse en seco o bien en inmersión.

Los objetivos de inmersión en agua y en aceite se utilizan para la observación directa de los objetos, con o sin cubreobjeto. La utilización del cubreobjetos sirve para aplanar la muestra o para proteger el objetivo. Para estos objetivos existen unos capuchones especiales con cubreobjetos de 0,15 a 0,3 mm de grosor: estos cubreobjetos se unen al objetivo con una gota de inmersión. Estos capuchones pueden también servir para los objetivos de seco, por ejemplo en el caso de observar material infeccioso.

Para los materiales más pequeños que el campo óptico, es necesario emplear portaobjetos en *vidrio negro*, de manera que se evitan los reflejos laterales e inferiores.

Como hemos podido constatar en múltiples ocasiones, los resultados obtenidos son excelentes. Dado que el haz iluminador no pasa por el objetivo, pero se encuentra exteriormente a él, rodeándolo, no debe temerse que los reflejos tan molestos con el iluminador opaco y puede usarse la abertura completa del objetivo para el estudio de la muestra.

Consideramos que la realización práctica de este tipo de iluminación constituye un gran progreso, tan importante como el que ha supuesto el perfeccionamiento de la iluminación del campo oscuro, conocido desde hace tiempo. A partir de entonces ha sido posible observar al microscopio el aspecto real de numerosas muestras y de tejidos, sin tener que aplanarlos, ni obtener cortes ni tampoco tener que transparentarlos. El estudio podría hacerse en vivo, sin ningún tratamiento previo. La fotografía de estas imágenes es tan fácil como la de las preparaciones microscópicas normales.

Método de R. Leroux. — R. Leroux diseñó en 1931 una técnica extremadamente interesante de observación histológica extemporánea con el Ultropak. La pieza a estudiar, en vivo o fijada, se adhiere por congelación parcial, con la ayuda de un chorro de anhídrido carbónico líquido, en el fondo de una cubeta especial, o *cubeta macrotómica* (fabricada por Leitz).

Se aplana la superficie mediante la cuchilla de un micrótomo. Esta cuchilla es guiada por una abrazadera de altura regulable mediante un tornillo. La superficie del corte se tiñe aplicando con pincel una solución de azul de toluidina al 1 % en alcohol metílico. Dejar actuar de 50 a 60 segundos para material fresco y durante escasos segundos cuando el material ha sido fijado con formol. Es suficiente que quede teñida únicamente la superficie. Seguidamente se cierra la cubeta, con lo que se deja una ventanilla para hacer la observación. El collar permite aprisionar, prensar convenientemente el vidrio de la ventanilla sobre la superficie del corte, de forma que se expulse el exceso de colorante. Cuando sea necesario se coloca una gota de glicerina sobre la ventanilla para asegurar el contacto con los conos de espejo que tienen los objetivos del Ultropak. Los aumentos más útiles son los que dan los objetivos Ultropak 6× y 11× asociados a un ocular de 8×. Cuando se trata de escasos aumentos se cogerán objetivos de 1× y de 4× con un ocular de 6×.

La tinción resulta muy demostrativa y presenta tonos muy variables, debido a la metacromasia que ofrece el azul de toluidina.

Cuando el material ha sido previamente fijado, basta teñir durante escasos segundos. Las piezas fijadas con formol pueden usarse directamente.

Las piezas fijadas con Bouin deben desteñirse previamente con una solución acuosa concentrada de benzoato de sodio, durante 12 horas a la estufa, a 56°.

Para las piezas fijadas o frescas, pueden, tras tinción previa, lavarse delicadamente con agua destilada con ayuda de un pincel, y después diferenciar durante algunos minutos con una solución muy diluida de ácido pícrico.

Método de Leroux y Champeau. — Una aplicación muy interesante del método de Leroux es la nueva técnica de la observación directa, con el Ultropak, de piezas incluidas en parafina. Previamente debe pulimentarse la superficie del bloque de parafina, hasta que quede totalmente lisa y brillante. Ello se consigue ante todo con una piedra de pulir de grano semifino, lubrificado con alcohol de 95° (nunca debe usarse agua): utilizar la superficie con movimiento giratorio, lavar con agua del grifo y continuar el pulimento con una piedra de afilar muy fina, lubrificada con alcohol. Terminar el pulimento pasando la muestra sobre un dedal de espejo o una placa de vidrio, lubrificada con alcohol y siempre imprimiendo al material un movimiento rotatorio. Debe proseguirse la operación hasta que el material sobresalga, de forma que pueda teñirse. El bloque será fijado por congelación en el fondo de la cubeta macrotómica, mediante unas gotas de agua. La tapadera de la ventana ya no tiene ninguna utilidad. Se tiñe con la ayuda de un pincel y se observará con el Ultropak con o sin interposición de un cubreobjetos o de un líquido de contacto. La capa celular superficial es la que se tiñe como se hacía en el caso de las piezas no incluidas.

Un procedimiento sencillo de observación con luz reflejada ha sido aconsejado por J.-L. Luntley. Se trata simplemente de una pequeña linterna, de 2 a 5 voltios, fijada a la platina mediante una grapa de latón portadora de un pequeño casquete apropiado. Debe escogerse más bien una lámpara de vidrio fuertemente engrosada en la parte anterior y formando una lente colectora. Se alimenta con una pila de bolsillo de gran capacidad o con un pequeño transformador.

MICROSCOPIA DE INFRARROJO

Aumentando la longitud de onda de la luz se disminuye el poder de resolución del sistema óptico; no son pues las observaciones a grandes aumentos las más apropiadas para llevar a cabo con la iluminación con infrarrojos. Algunas muestras, sobre todo las que están intensamente pigmentadas de melaninas, son muy opacas en las observaciones con luz normal y bastante transparentes cuando se observa con luz infrarroja, lo mismo ocurre cuando se estudian los tegumentos de los coleopteros o los fosiles de los quitinozoarios. En estos casos es evidente el interés con una lámpara de infrarrojos. Dado que los objetivos, salvo los que están dotados de espejos, no se han corregido previamente para el infrarrojo se debe poder efectuar el enfoque previamente a la impresión de la imagen sobre una emulsión sensible a esta longitud de onda. Esto se consigue con la ayuda de los «tubos convertidores de imágenes». En los equipos modernos estos tubos son intercambiables con tubos convertidores de ultravioleta, lo que permite disponer de un equipo de puesta a punto fuera del visible universal.

A nivel de la iluminación la selección en la franja del infrarrojo se hace mediante filtros, de vidrio o bien interferenciales, si se quiere una banda estrecha.

Es interesante retirar todos los filtros o espejos anticalóricos que podamos encontrar en el sistema de iluminación, así como sobrevoltar la lámpara para tener un buen rendimiento del infrarrojo.

La utilización de películas especiales del tipo de «transposición», tales como las que se utilizan para fotografía aérea permite obtener fotomicrografías muy instructivas entre el espectro visible y el infrarrojo, en las que es un color arbitrario del visible el que traduce el infrarrojo.

Cuando no se dispone de un convertidor de imágenes para hacer el enfoque, puede efectuarse tomando una serie de clichés con un desfase de una micra del movimiento micrométrico, controlado fácilmente. Tras el revelado se aprecia cuál es el enfoque correcto que será adoptado en lo sucesivo, pero ¡cuidado!: debe repetirse la operación para cada objetivo, sobre todo cuando los aumentos sean diferentes.

MICROSCOPIA CON ULTRAVIOLETA

Dos razones de peso aconsejan la utilización de una iluminación ultravioleta: el incremento del poder de resolución, que puede llegar a doblarse, la absorción selectiva de ciertas longitudes de onda por parte de determinados componentes celulares como pueden ser los ácidos ribonucleicos.

Numerosas dificultades surgen en la práctica, lo que hace que estos métodos no hayan alcanzado el eco que merecen.

Ante todo, cabe señalar que estas fuentes lumínicas son costosas, frecuentemente inestables y peligrosas para el ojo del operador.

Los objetivos deben estar especialmente corregidos, generalmente se trata de objetivos con espejo o mixtos (catadióptricos), las capas reflectantes que poseen envejecen rápidamente bajo el efecto catalizante de las radiaciones U.V. Como consecuencia se produce una rápida disminución

del poder reflector y el objetivo ya no puede utilizarse. Incluso algunas lentes del objetivo sufren ciertas alteraciones bajo la incidencia de las radiaciones ultravioleta (fig. 38).

Los manantiales de luz más frecuentemente utilizados son: lámparas de cuarzo con descarga en vapor de mercurio de alta presión, lámparas de descarga en hidrógeno, lámparas de arco de cadmio, evidentemente asociadas a filtros de banda estrecha, o incluso mejor, que sean monocromáticos U.V.

Los objetivos con espejo (catóptricos puros) tienen una gran ventaja sobre los restantes: puede hacerse el enfoque con luz visible, conservándose integralmente cuando se trabaja con U.V., sea cual fuere la longitud de onda con la que se trabaja. Para los otros objetivos generalmente debe hacerse una corrección con repecto a la banda verde de mercurio, disponiéndose para ello un mando de movimiento fino graduado con una precisión del orden de una decena de micras. Es por ello que algunos estativos, especialmente diseñados para la observación con la luz ultravioleta, disponen de tres tipos de enfoque: rápido, fino y ultrafino.

Véanse en la página 114 las bandas U.V., las más frecuentemente utilizadas y sus aplicaciones. Casi todas las proteínas son opacas por encima de las 0,250 μm, es la ventana del 0,275-0,375, que es la más utilizada. Únicamente la glicerina es transparente a la luz ultravioleta. Debe usarse sólo como medio de montaje y de inmersión, los cubreobjetos así como los portaobjetos deben ser de cuarzo.

Referente al poder de resolución remitimos al lector a la figura 13.

LOS MODULADORES PUPILARES

Los estudios llevados a cabo por Abbe hacen destacar dos planos de gran interés presentes en el objetivo del microscopio: se trata del plano focal anterior o plano focal del objeto, que es donde se forma la imagen cuando el objetivo proyecta la imagen al infinito y el plano focal posterior (detrás) o plano focal interno que es el lugar de formación, por la transformada de Fourier, de la imagen de difracción del objeto u holograma. Es ésta la que se observa en «conoscopia», es la primera en observarse en «ortoscopia». Cuando se estudia la distribución de las amplitudes y las fases en el plano focal posterior de un objetivo potente se aprecia una cierta modulación principalmente marginal. Podemos utilizar esta modulación debida principalmente a la estructura del objetivo para modificar los contrastes de las imágenes. Es lo que hace Heine con Leitz produciendo un efecto de contraste de fases con un condensador pancrático (de distancia focal variable) que proyecta un anillo delgado de iluminación, tangente al reborde del plano focal posterior (pupila de salida) del objetivo. Es lo que hacen los compensadores variados empleados en polarización. Es también como actúan las placas de fases, aunque de forma muy localizada. En este último caso, la discontinuidad de la placa de fases introduce un efecto parásito responsable del halo que rodea la imagen, aparte del efecto de contraste.

Tal como ha demostrado Locquin (1953) es posible construir un modificador pupilar, que funciona con luz natural y sin discontinuidades, para realizar un contraste de fases sin franjas. El mo-

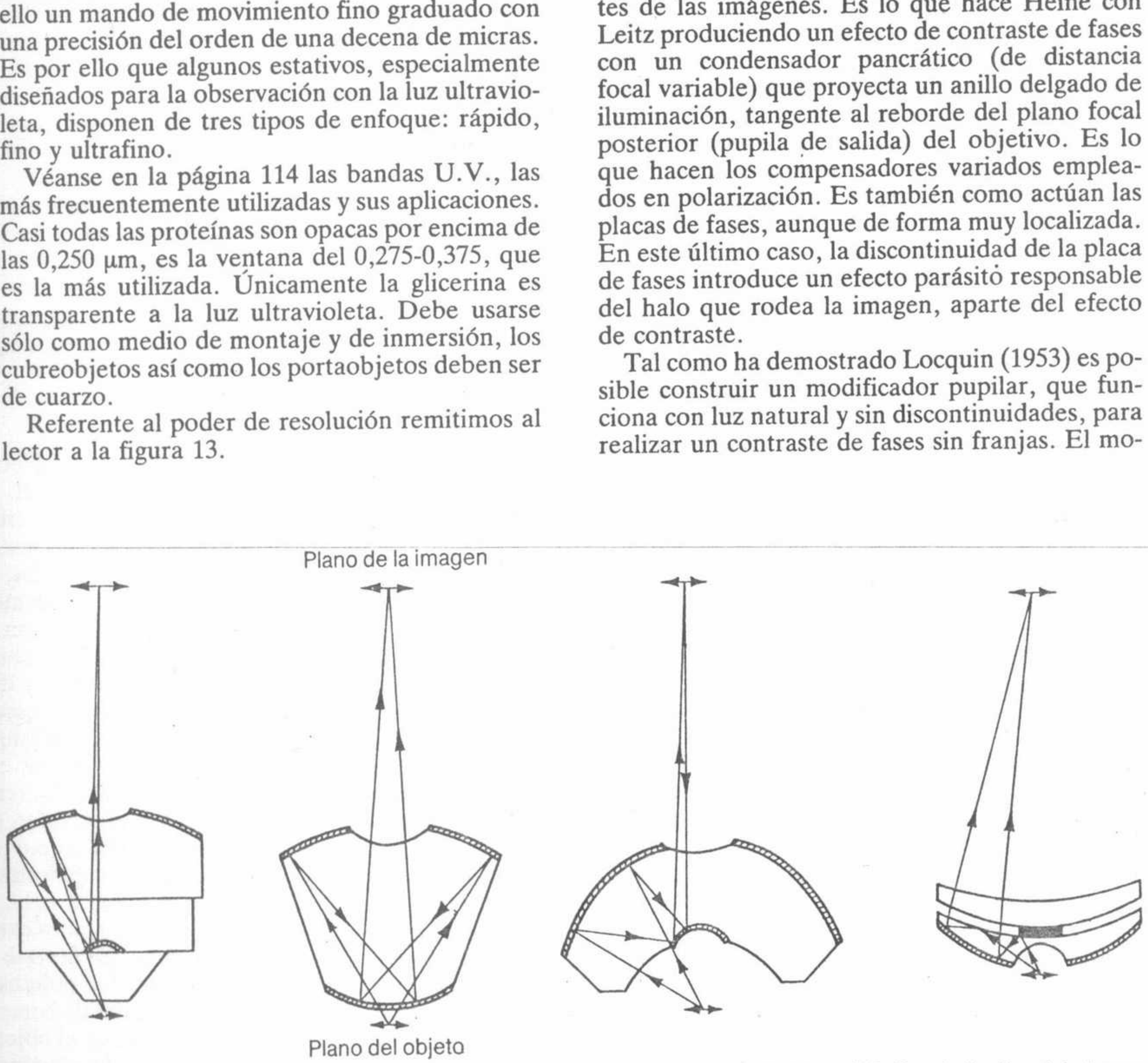


FIG. 38. — *Cuatro tipos de objetivos catadióptricos para la luz visible, la U. V. y el I. R., derivados del sistema Schwarzschild.* De izquierda a derecha, objetivos de aumentos crecientes.

dulador está formado por un filtro de Fabry-Perrot que modula la luz incidente, en amplitud y en fase, a medida que nos alejamos del eje óptico. Otros dos dispositivos, anteriormente diseñados, menos completos, también son utilizados: el objetivo con pantalla interna deslustrada de Spierer y Locquin y el anoptral de Wilska. Estos dos equipos únicamente modulaban las amplitudes.

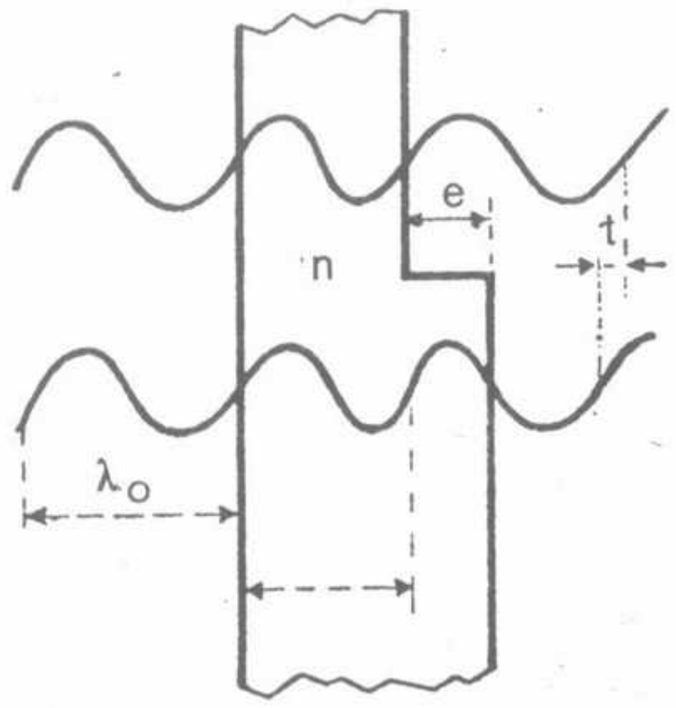
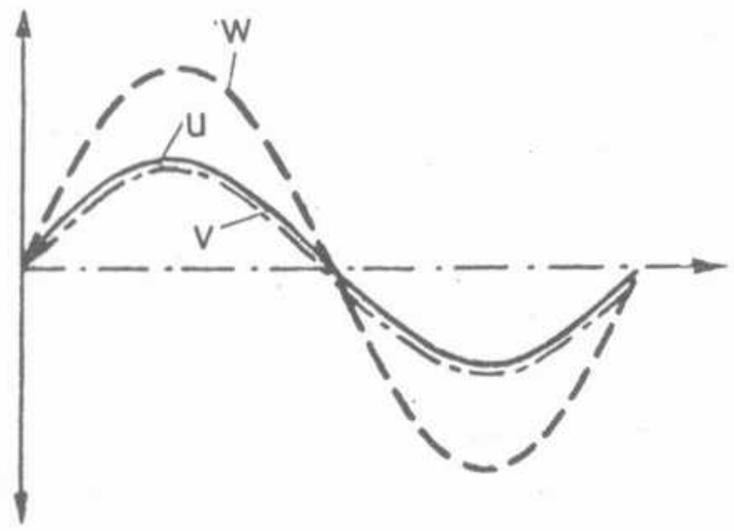


FIG. 39. — *Un sobreespesor* e *en un objeto de índice homogéneo introduce un escalón de fase o desfase* t. *Marcha de los rayos de izquierda a derecha.*



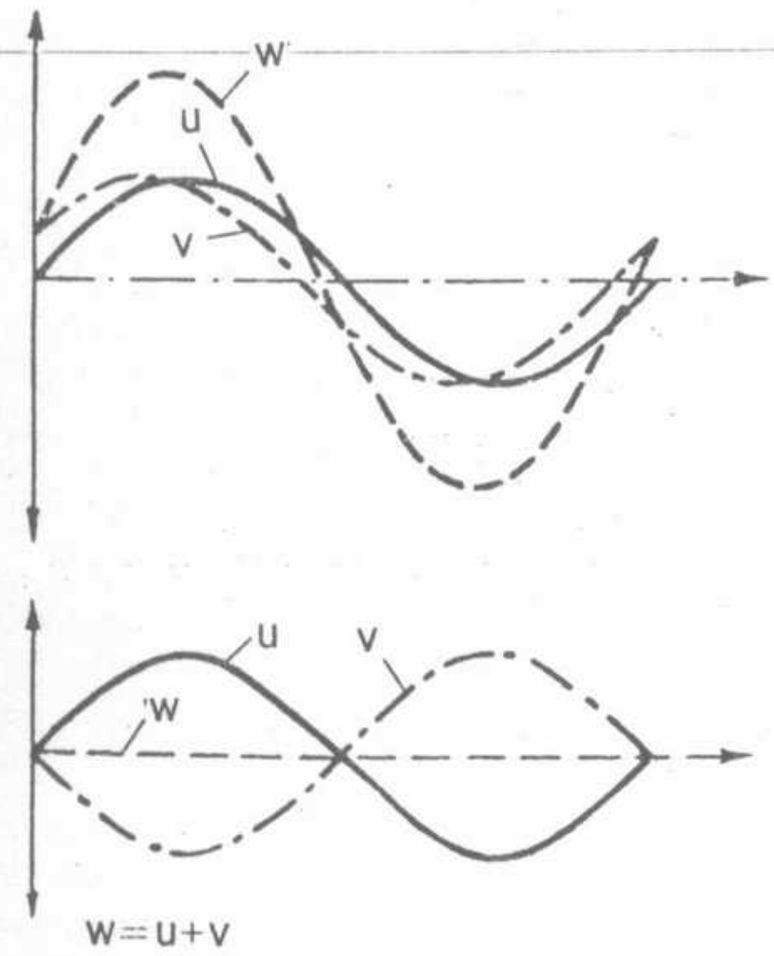


FIG. 40. — *Interferencia de dos ondas* y *y* v *y su resultante* w *en tres casos: arriba, concordancia de fases; abajo, discordancia de fase; en el centro, desfase parcial.*

La siguiente tabla resume los principales moduladores pupilares con el nombre del autor que los ideó.

MODULADORES PUPILARES

A. — **Utilizables con luz natural**

1.° **Con estructura discontinua**

a) Fondo negro central: Objetivo de Spierer con reflector interno.
b) Atenuador anular: Contraste anoptral de Wilska.
c) Placa de fases anulares: Contraste de fases de Zernike.
d) Placa de fases interferencial: Contraste coloreado de Locquin, Varicolor.
e) Doble placa de fases, coloreada: Contraste coloreado de Zernike.
f) Placa de fase con gran dispersión: Contraste coloreado Interphako.

2.° **Con estructura continua**

a) Con pantalla central deslustrada: Objetivo Spierer-Locquin.
b) Filtro de Fabry-Perrot sobre espejo: Dyson.
c) Filtro de Fabry-Perrot sobre la lente frontal del objetivo o sobre el cubreobjetos: Contraste variable de Locquin: Modecla.

B. — **Utilizables con luz polarizada**

1.° **Con estructura discontinua**

a) Placa de fase de semionda: Contraste de fases variable de Locquin.
b) Placa de fases compleja: Contraste variable de Osterberg.
c) Placa de fases rotatoria: Contraste variable de Taylo.

2.° **Con estructura continua**

a) Accesorios del microscopio de luz polarizada:
Cuarzo, tinta sensible, rojo de 1.er orden.
Mica cuarto de onda de Sénarmont, para la polarización circular.
Cuarzo de cuá de 1.er a 3.er orden.
Mica giratoria de Brace-Köhler, decena, a treintena de onda.
Compensador giratorio de Eringhaus, Cuarzo o Espato, 7 órdenes.
Compensador de Babinet.
Láminas de penumbra.
Láminas de semionda.
Láminas de una onda.
Láminas vasculantes de fluoruro de magnesio.
Láminas vasculantes de calcita: 30 órdenes.

b) Componentes del microscopio interferencial:
Compensador de Mach-Zender, Interphako.
Compensador de Wollaston, CNRS-Nomarski.
Compensador Jamin-Lebedeff: Leitz.
Compensador de Savart, Blaisse o Françon.
Compensador Babinet-Sol, Philpot.
Compensador semionda + compensador Macé de Lépinay-Locquin.

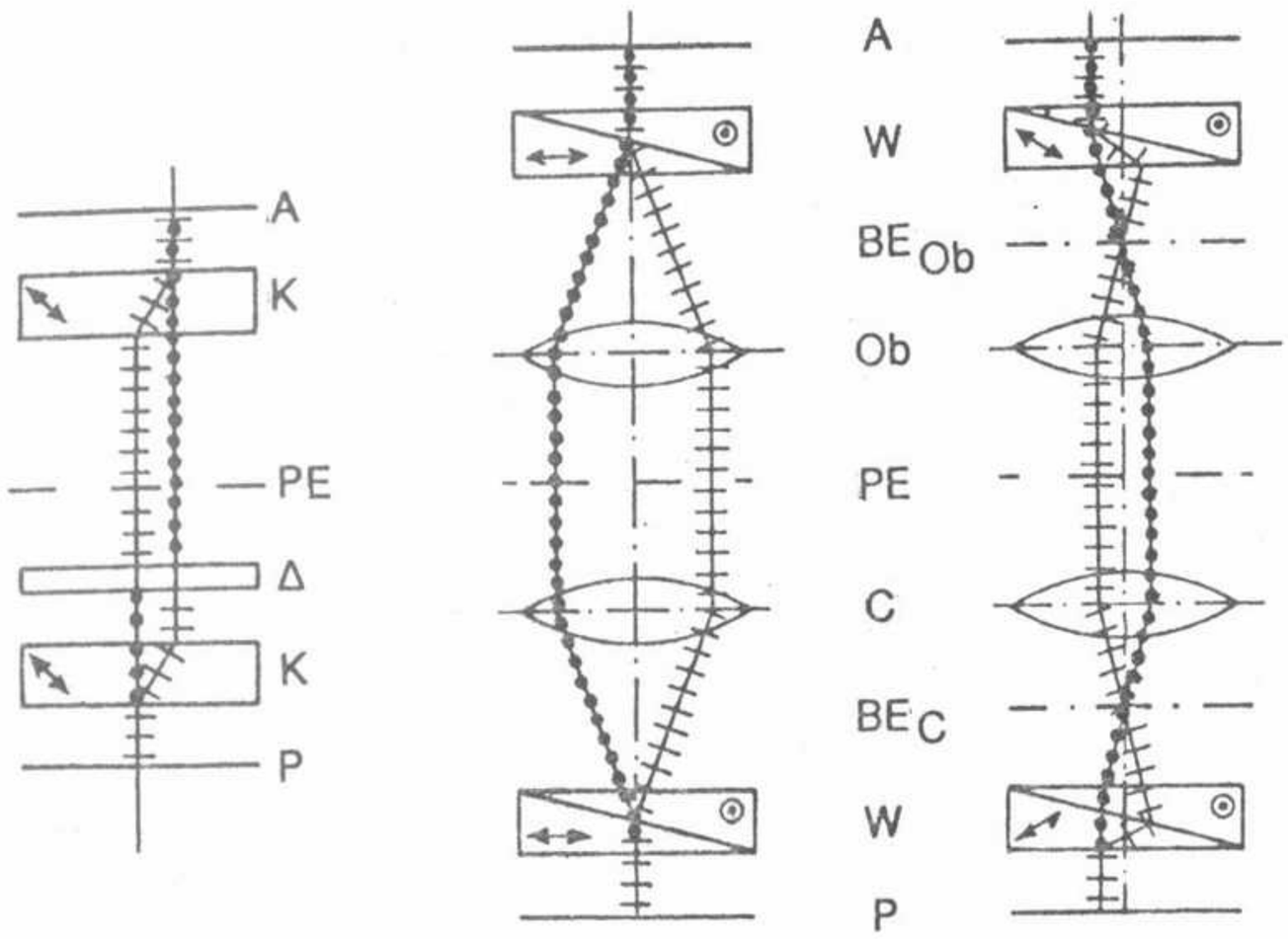


FIG. 41. — *Marcha de los rayos en tres interferómetros empleados en microscopia interferencial por transmisión.* P, polarizador; W, Wollaston; Δ, lámina semionda; PE, plano del objeto; Ob, objetivo; C, condensador; A, analizador; K, lámina de cuarzo; BEob, plano focal del objetivo; BEc, plano focal del condensador. Los puntos situados sobre la trayectoria de los rayos indican que la dirección de las vibraciones lumínicas polarizadas es perpendicular al plano del papel, las líneas indican que es paralela.

LOS MICROSCOPIOS INTERFERENCIALES

Existen en principio tres tipos de microscopios interferenciales: los microscopios interferenciales de longitud desdoblada, los de dos ondas y los de ondas múltiples.

Los primeros, los de una sola onda, generalmente se denominan «microscopios de contraste de fases», aunque en la realidad se trata de auténticos microscopios de interferencia, dado que mediante una iluminación especial podemos separar la onda incidente en dos haces, uno de los cuales no queda afectado por el objeto, mientras que el otro sí, y es por recombinación interferente de ambos tipos de rayos —uno habiendo sido convenientemente desfasado con respecto al otro— que se obtiene la imagen final. En la mayoría de los dispositivos el desfase producido por la placa de fases del objetivo es constante.

Los segundos, los de dos ondas, son los auténticos microscopios interferenciales. A nivel del sistema de iluminación, antes de atravesar el material, sistemas ópticos diversos, atendiendo a los constructores desdoblan el rayo incidente en dos haces próximos uno del otro y este desdoblamiento es generalmente variable a gusto del operador; un segundo sistema óptico, simétrico al primero, pero situado detrás del objeto, recompone los dos haces haciéndolos interferir para construir la imagen (figs. 41, 42 y 43).

El tercer tipo, denominado de ondas múltiples, no es demasiado utilizado en microscopia biológica; por el contrario, se lo utiliza mucho en metalografía, para la medida de la profundidad de las estructuras, se trata de los «microinterferómetros de bandas anchas» que superponen a la imagen del objeto una red de franjas paralelas, modificadas a su vez por la estructura del objeto.

M. Locquin diseñó, por primera vez, en 1948, un dispositivo de observación en microscopia interferencial encerrando el objeto en un interferómetro de Fabry-Perrot, realizado con la ayuda de una capa delgada, semitransparente, depositada sobre un portaobjetos y por una película plástica ultradelgada que recubre el objeto y que también está semimetalizada. Un objeto, montado de esta

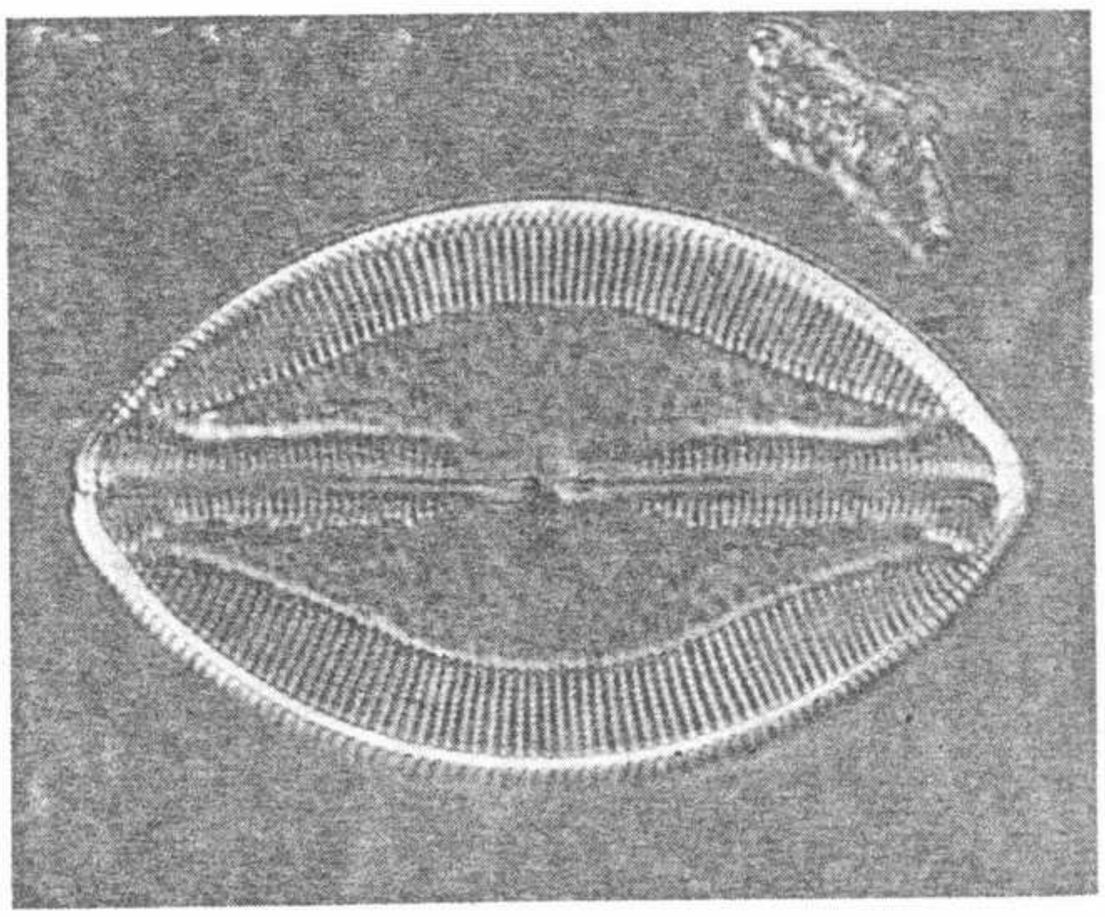


FIG. 42. — *Imagen obtenida con contraste interferencial según Nomarski de la diatomea* Navicula clavata, Gregory. Ultraphot Zeiss, objetivo planapocromático de 40 ×, aumentos aproximados 1000 ×, película Polaroid PN55. Cliché P. Fusey, Laboratorio de Criptogamia del Museo Nacional de Historia Natural, París.

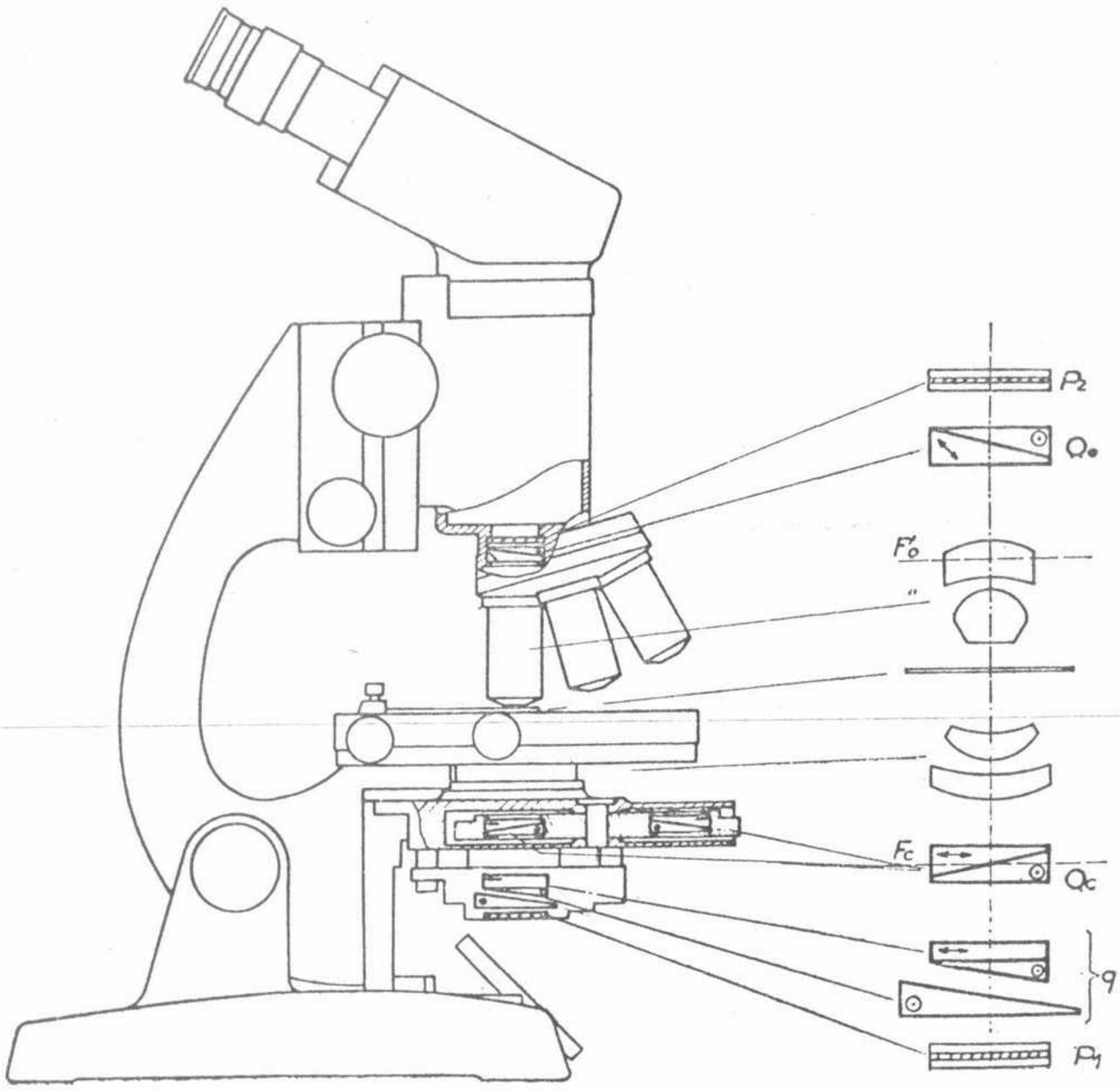


FIG. 43. — *Esquema de la disposición de los elementos que constituyen el dispositivo interferencial según Nomarski en un microscopio BBT*, P1 y P2, Polars; Qo y Qc, Wollastons; q, Wollaston con desdoblamiento variable. Documento B. B. T. París.

manera, colocado sobre la platina de un microscopio ordinario, da una imagen de contraste interferencial de aspecto plano si el material es extremadamente delgado, con franjas múltiples si es más grueso. Este dispositivo tiene la ventaja de ser utilizable con el microscopio normal de fondo claro.

EL CONTRASTE DE FASES

Después de la última guerra constituyó un gran cambio en las costumbres de los microscopistas, saber que, sin necesidad de aplicar tinciones letales, podían observar estructuras vivas, por muy delgadas que fueran, teniendo una imagen clara y detalles internos altamente contrastados, viéndose perfectamente bien los núcleos, nucléolos, mitocondrias, etc. Este descubrimiento se debió a F. Zernike y le valió el Premio Nobel.

Para comprender los mecanismos del contraste de fases el lector deberá volver a leer los mecanismos fundamentales de la formación de imágenes al microscopio, tal como las estableciera Abbe, el gran físico de renombre universal.

Constatamos que en microscopia los materiales pueden clasificarse en dos grandes grupos: los materiales más o menos teñidos o negruzcos, que absorben cierta cantidad de la luz incidente, y modifican así la densidad y el color, son los «objetos de amplitud», y los materiales incoloros, generalmente delgados, cuyos contornos y detalles únicamente aparecen sobre fondo oscuro, dado que en fondo claro hay poco contraste, se trata de los «objetos de fases». Los físicos establecieron que existía una importante diferencia entre estas dos categorías de objetos, diferencia observable a nivel de plano focal del objeto para los estados de fase respectivos de los pinceles difractados por el objeto, con relación a la luz directa no modificada por éste. Entre ambos existe, en el caso de los objetos de fase, un desfase del orden de $\lambda/4$ que no existía para los objetos de amplitud. De ahí la idea de Zernike de compensar este desfase producido al atravesar el objetivo por la influencia modificadora de una «lámina de

fases» o placa de fases que, por compensación, da el estado de fases que tendría un objeto de amplitud y transforma de esta manera los contrastes de fases en contrastes de amplitud: el objeto transparente queda contrastado sin la intervención de colorantes. En la práctica, las placas de fases tienen una forma anular, están situadas en el plano focal interno de los objetivos. En el condensador el constructor ha dispuesto anillos transparentes de iluminación centrables y conjugados de cada placa de fases. Dado que las placas de fases son igualmente absorbentes para reducir la intensidad de la luz directa, un sistema auxiliar de enfoque permite ajustar el uno sobre el otro para tener un perfecto centrado. Cuando el diafragma y la placa de fases están centrados, puede efectuarse la observación (figs. 45, 46 y 47).

Al utilizar el microscopio de contraste de fases deben tenerse en cuenta los siguientes puntos: las estructuras a observar deben estar sin teñir o escasamente teñidas, no deben tener paredes gruesas y deben ser extremadamente delgadas, no deben abarcar toda la superficie del campo de observación, para permitir que una parte importante de la onda incidente no sea modificada por el objeto. Las superficies ópticas, tanto del microscopio como de la preparación, deben ser muy limpias. La fuente lumínica debe ser muy intensa, mucho más que para las observaciones en fondo claro, debido a la reducción anular del flujo incidente y sobre todo de la absorción de la placa de fases.

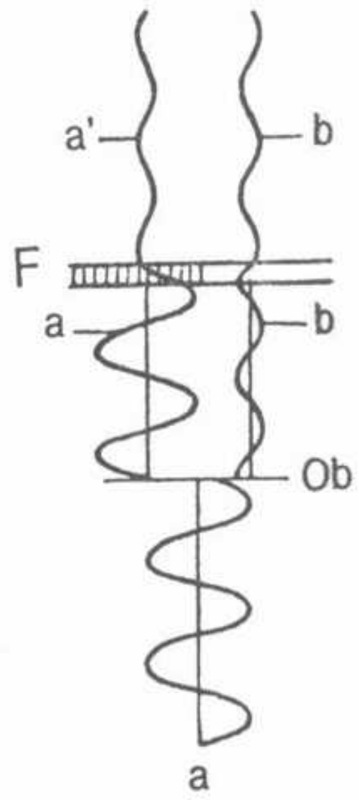


FIG. 44. — *Cambio de fases y de amplitudes al atravesar la luz el objeto Ob, después de la placa de fase* Ph; *a izquierda rayo directo, a derecha rayo difractado.*

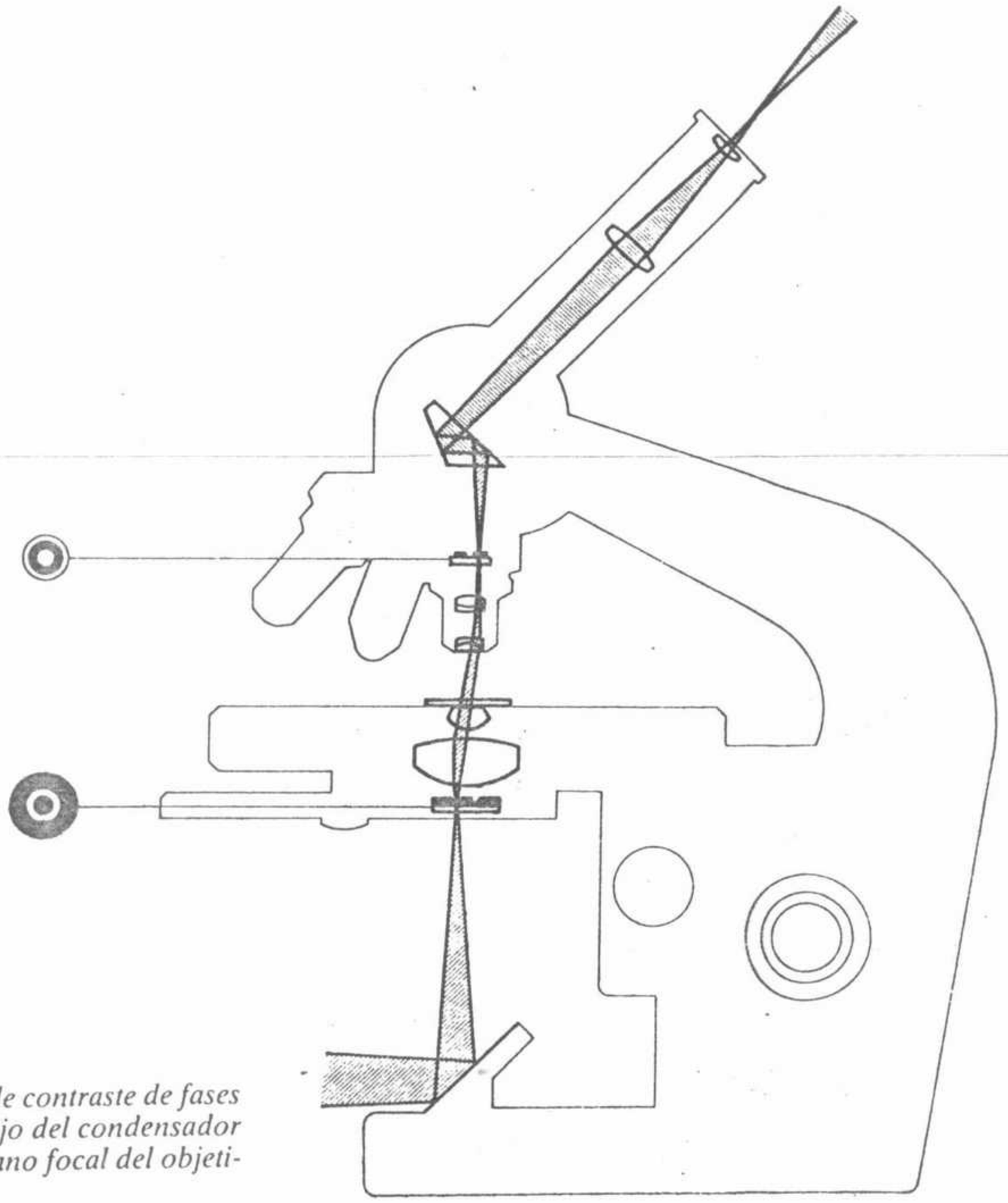


FIG. 45. — *Corte de un microscopio de contraste de fases mostrando el diafragma anular, debajo del condensador y la placa de fases conjugada en el plano focal del objetivo.* Documento Wild-Heerbrugg.

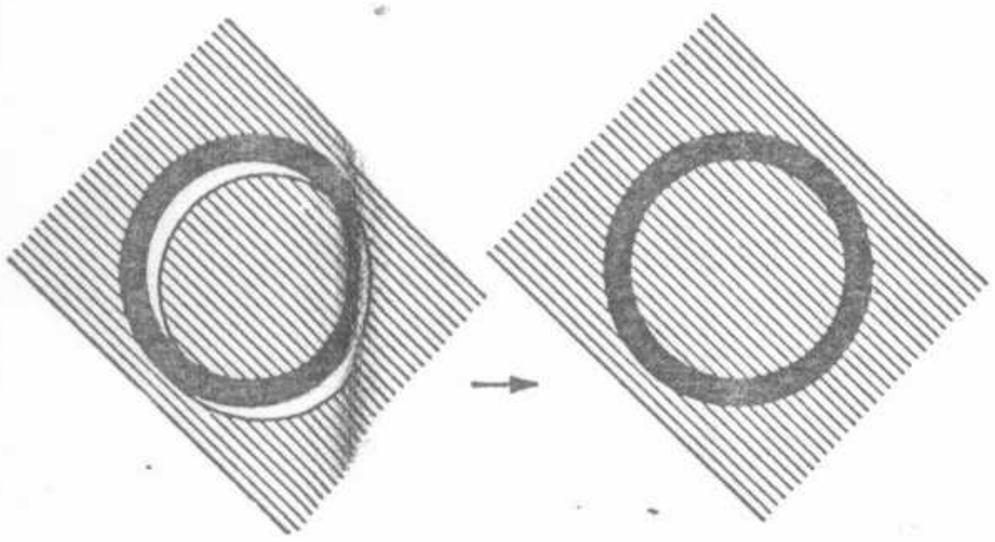


FIG. 46. — *Centrado del anillo de iluminación sobre la placa de fases. Observado a través del microscopio auxiliar de centrado* (lente de Amici Bertran). Manipulando con los tornillos de centrado del diafragma del condensador, se sitúa la imagen clara de forma que coincida con la imagen de la placa de fases. Si no hay una imagen nítida, es debido a que el objeto, demasiado difusor, no se presta a ser observado con el sistema de contraste de fases.

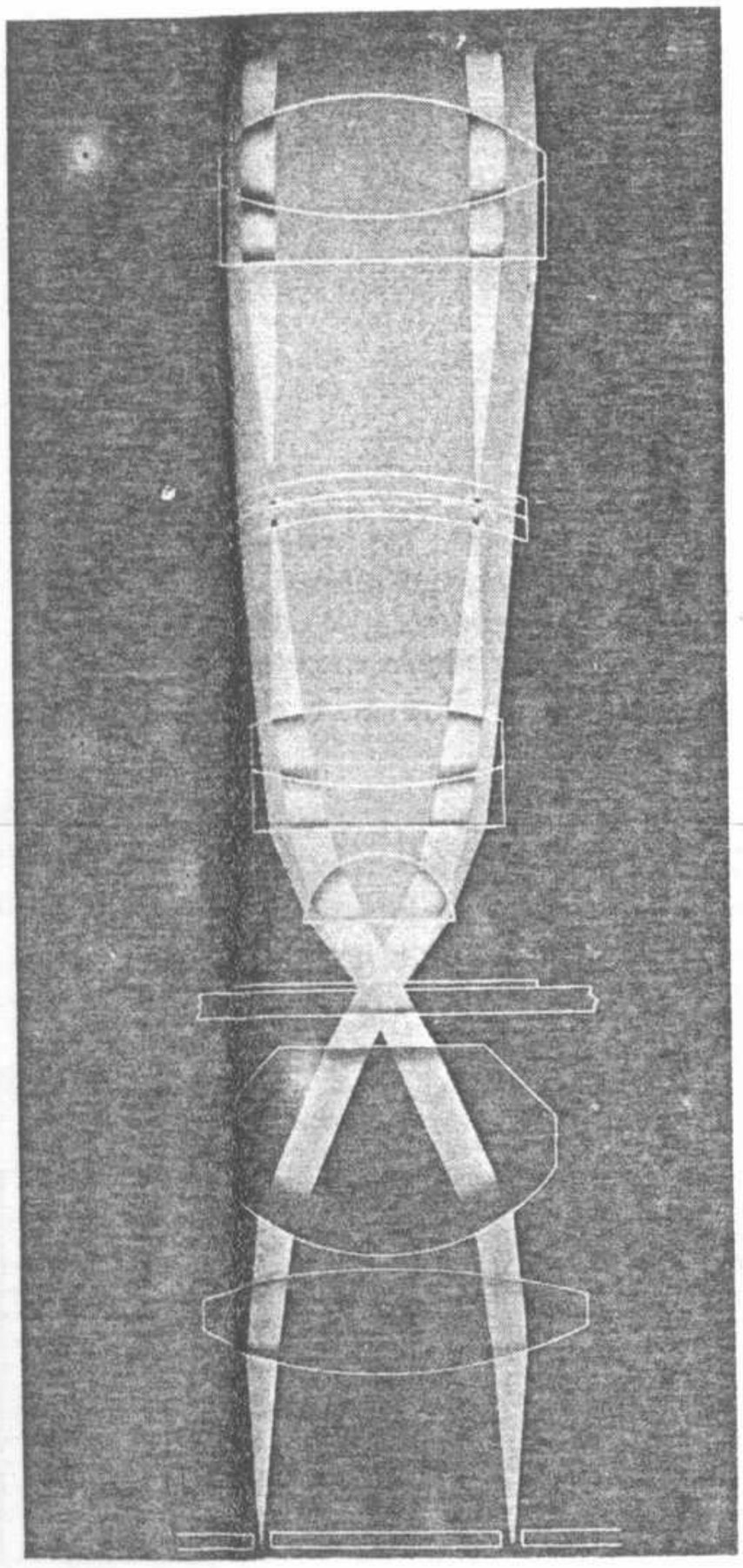


FIG. 47. — *Trayectoria de los rayos en un microscopio de contraste de fase.* La luz difractada, en gris, es separada de la luz directa, en blanco. Documento Leitz-Wetzlar.

Hay tres tipos fundamentales de placas de fases y en cada grupo hay numerosas variantes de absorción:

— Las placas de fases denominadas «positivas» que dan de un objeto más refringente que el medio de montaje una imagen oscura sobre fondo gris.

— Las placas de fases «negativas» que dan del mismo objeto una imagen parecida a la obtenida de una imagen en fondo negro pero más rico en valores medios y en detalles.

— Las placas de fases interferenciales, Locquin (1950), dando por superposición de estos dos efectos en dos dominios diferentes de longitud de onda un contraste coloreado. Este último modelo ha sido sustituido por microscopios interferenciales de dos ondas.

Las placas de fases positivas son las más utilizadas. Se aprecia en la imagen un halo característico que rodea cada estructura, este halo no existe en el auténtico contraste interferencial verdadero.

EL MICROSCOPIO DE LUZ POLARIZADA

Para estudiar las estructuras biológicas con el microscopio de luz polarizada, no es necesario hacer estudios cristalográficos completos, salvo en el caso particular que interese estudiar inclusiones cristalinas; tampoco se requiere tener nociones importantes de óptica. En las próximas líneas resumimos lo esencial para sacar el máximo provecho biológico del instrumento.

La luz tiene una naturaleza semiondulatoria, mediocorpuscular. Es el efecto ondulatorio el que nos interesa en este momento.

Por convicción general se considera que el sentido de propagación y de rotación se consigue a partir de un rayo superpuesto que viene siempre hacia el observador, como en el microscopio.

La luz natural, la que nos inunda durante el día, al igual que la emitida por una lámpara de microscopio, vibra en el transcurso de su propagación, de forma aleatoria, en todas las direcciones perpendiculares a ella. Si esta luz es reflejada por una superficie pulimentada o si cruza «polarizadores», se denominará polarizada. Hay varios tipos de polarización: la polarización rectilínea, en que la vibración no se produce más que en un solo plano, denominado de polarización. La polarización circular, en que el vector que vibra gira avanzando como si fuera una hélice, la polarización elíptica en la que la proyección del vector ya no es circular, sino elíptica en un plano perpendicular a la dirección de la propagación. En estos dos últimos casos puede haber dos sentidos de rotación: el sentido derecho, sentido de las agujas de un reloj, el sentido izquierdo, su inversa (figs. 48 y 49).

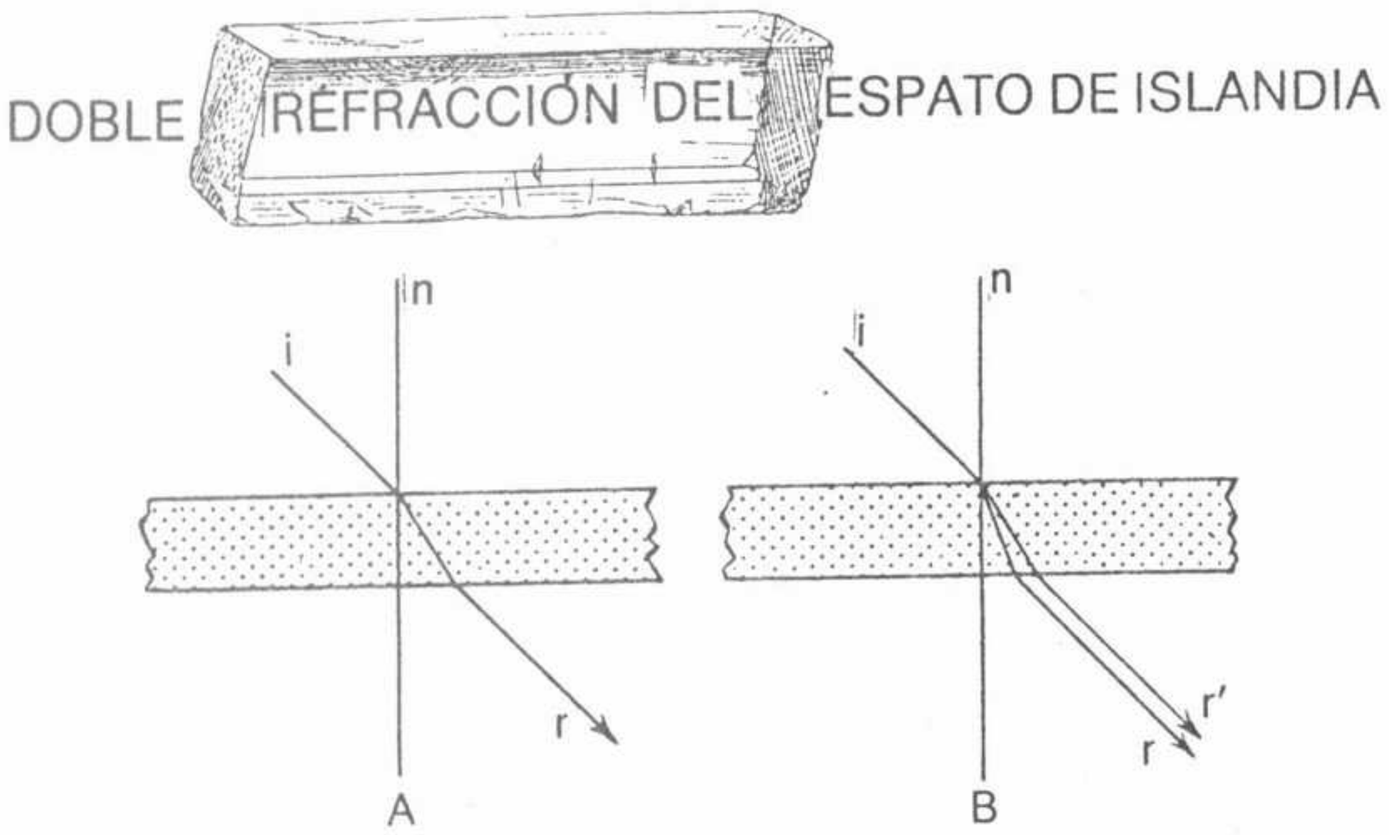


FIG. 48. — *Doble refracción.* Monorrefringencia A y Birrefringencia B; i, rayo incidente, r y r', rayos refractados.

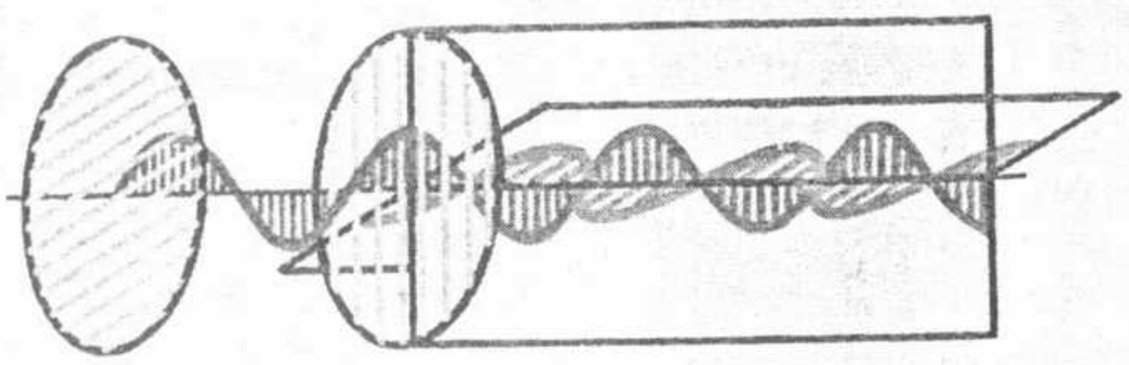


FIG. 49. — *Polarización de la luz.* De izquierda a derecha: la luz natural vibra en todas las direcciones, atravesando un polarizador únicamente vibrará en un plano, un analizador cruzado, es decir, perpendicular, lo detiene completamente; el campo es oscuro. Documento Wild-Heerbrugg.

Para determinar el eje de un polarizador, se gira oblicuamente la superficie del vidrio. El eje es vertical cuando desaparecen los reflejos que son polarizados al reflejarse sobre la superficie del vidrio.

Cuando los ejes de los dos polarizadores están cruzados hay extinción. Esta extinción es más completa cuando el polarizador es de mejor calidad (fig. 50).

Se dice que una estructura o material es birrefringente, si al colocarlo entre dos polarizadores cruzados restablece parcialmente la luz —hacer la experiencia con una película de celofán—. ¿Qué ocurre entonces?

Los rayos son refractados por el objeto de dos maneras distintas: uno denominado rayo ordinario sigue las leyes ordinarias de la refracción, siguiendo la ley de Descartes: sen $i = n$ *sen* r; el otro se denomina rayo extraordinario, vibra formando un ángulo recto con el precedente y se propaga con otra velocidad, lo que quiere decir que la sustancia birrefringente tiene dos índices de refracción. Inicialmente los polarizadores eran de espato de Islandia, convenientemente tallados para eliminar por reflexión total, tras absorción del rayo ordinario. Actualmente se cons-

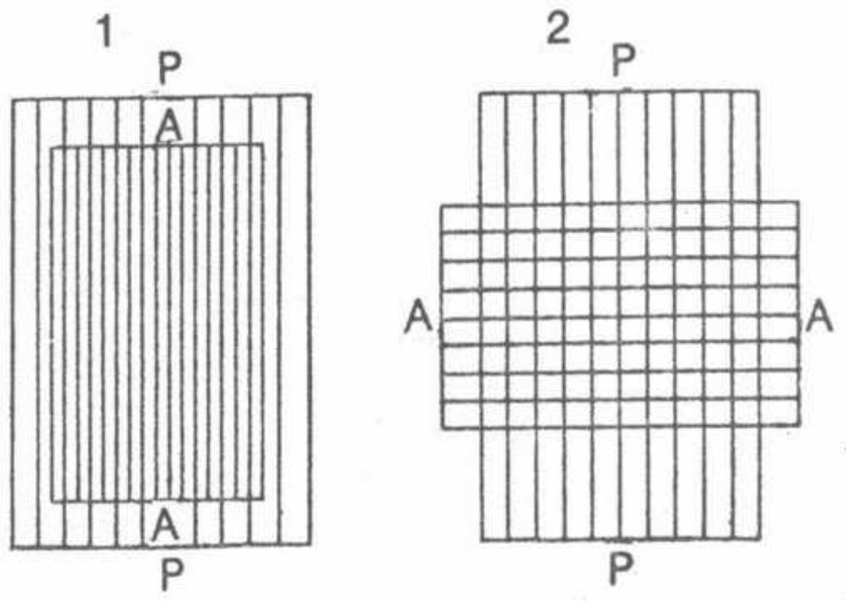


FIG. 50. — *Esquema del funcionamiento de los polarizadores, representado aquí por rejillas:* 1 *paralelas,* 2 *cruzadas.*

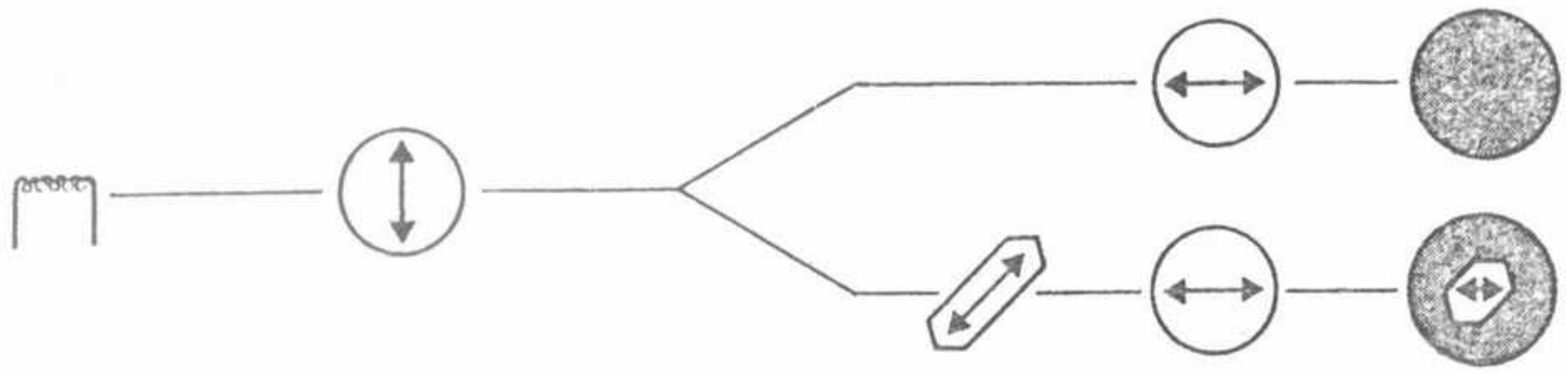


FIG. 51. — *Iluminación de un objeto birrefringente entre polarizadores cruzados.* De izquierda a derecha: filamento, polarizador vertical, analizador horizontal; arriba, sin objeto, abajo con objeto birrefringente. El objeto birrefringente se ilumina sobre un fondo oscuro. Documento Wild-Heerbrugg.

truyen con películas de tonalidad grisácea, neutras y absorbentes del rayo ordinario por su propio grosor, son los «polares» o «polaroides», nombre dado en honor de su principal fabricante (fig. 51).

Habitualmente, en microscopia, se observa una imagen real del objeto. Se trata del método de observación «ortoscópica». Cuando se localiza el plano focal del objetivo mediante una lente de enfoque para llevar a cabo las experiencias de Abbe o para centrar la iluminación de una placa de fases, haciéndose la observación «conoscópica», mal denominada «iluminación convergente». Esta observación conoscópica permite observar figuras de interferencias holográficas que se producen a nivel del plano focal del objetivo. Para mayor comodidad, en lugar de la lente auxiliar se incorpora al microscopio de luz polarizada una lente abatible, denominada «lente de Bertrand» o de «Amici-Bertrand», que permite esta focalización de manera extremadamente sencilla y cómoda.

Toda luz polarizada rectilíneamente puede ser descompuesta según dos vectores en ángulo recto, que son en el microscopio los dos «ejes» de los polos. La fórmula de esta descomposición es:

$$a = p \cos \alpha$$
$$b = p \operatorname{sen} \alpha$$

en que α designa el ángulo del vector con el plano del polarizador; vemos que si toda la luz vibra según el plano *a,* no pasará ningún rayo según *b,* en el caso en que α sea nulo. Por el contrario, cuando α no es nulo, la intensidad lumínica que pasará vendrá dada por la fórmula:

$$I_{An} = I_p \cos^2 \alpha = \frac{1}{2} I_o \cos^2 \alpha$$

dado que todo polarizador elimina, cuando es atravesado, la mitad de la intensidad incidente, en el transcurso del fenómeno de la polarización, por eliminación del rayo ordinario.

Si entre los dos polaroides se encuentra un objeto birrefringente, tal como hemos visto; dicho objeto tendrá dos índices de refracción, los dos rayos pues serán el resultado de ello, las dos ondas que lo atraviesan progresan a distintas velocidades, un rayo se retrasa con respecto al otro. Cuando abandonan el medio birrefringente o anisótropo prosiguen su camino independientemente, manteniendo siempre el mismo retraso. Cuando atraviesa el analizador éste selecciona, atendiendo a su componente *b* las dos fracciones que, al vibrar en un mismo plano, serán capaces de interferir para formar la imagen.

Para facilitar las observaciones cualitativas y las mediciones, el usuario del microscopio de luz polarizada dispone en el tubo de su microscopio una hendidura oblicua, a 45° de los polos, en la que pueden introducirse «compensadores» fijos o móviles, la platina del microscopio es giratoria y centrable y puede hacer girar el objeto sobre sí mismo, manteniéndolo en el campo de observación. En algunos modelos de estativos los polarizadores están acoplados por una barra y son giratorios, permaneciendo fija la muestra.

Utilización del microscopio de luz polarizada

El microscopio de luz polarizada informa sobre las propiedades ópticas de las estructuras, atendiendo a su birrefringencia. Por consiguiente, puede utilizarse para determinar estas propiedades ópticas y verificar de esta manera la naturaleza química del objeto. El microscopio de luz polarizada tiene como una de sus más interesantes aplicaciones el estudio de las rocas desgastadas hasta constituir preparaciones delgadas. En estos cortes se puede reconocer fácilmente la naturaleza de los minerales constituyentes, por la forma de los cristales y por los brillantes colores que adquieren entre nícoles cruzados. Este estudio se escapa de nuestro dominio, pero podemos obtener de él interesantes enseñanzas para la aplicación del microscopio de luz polarizada en la histología animal o vegetal (fig. 52).

Ciertamente hay que admitir que, por desgracia, este instrumento es poco utilizado en biología. Sin embargo, es posible evidenciar algunos elementos birrefringentes de los tejidos, con una nitidez muy superior a la que nos daría cualquier método tintorial o de impregnación. Puede incluso poner de manifiesto estructuras imposibles de

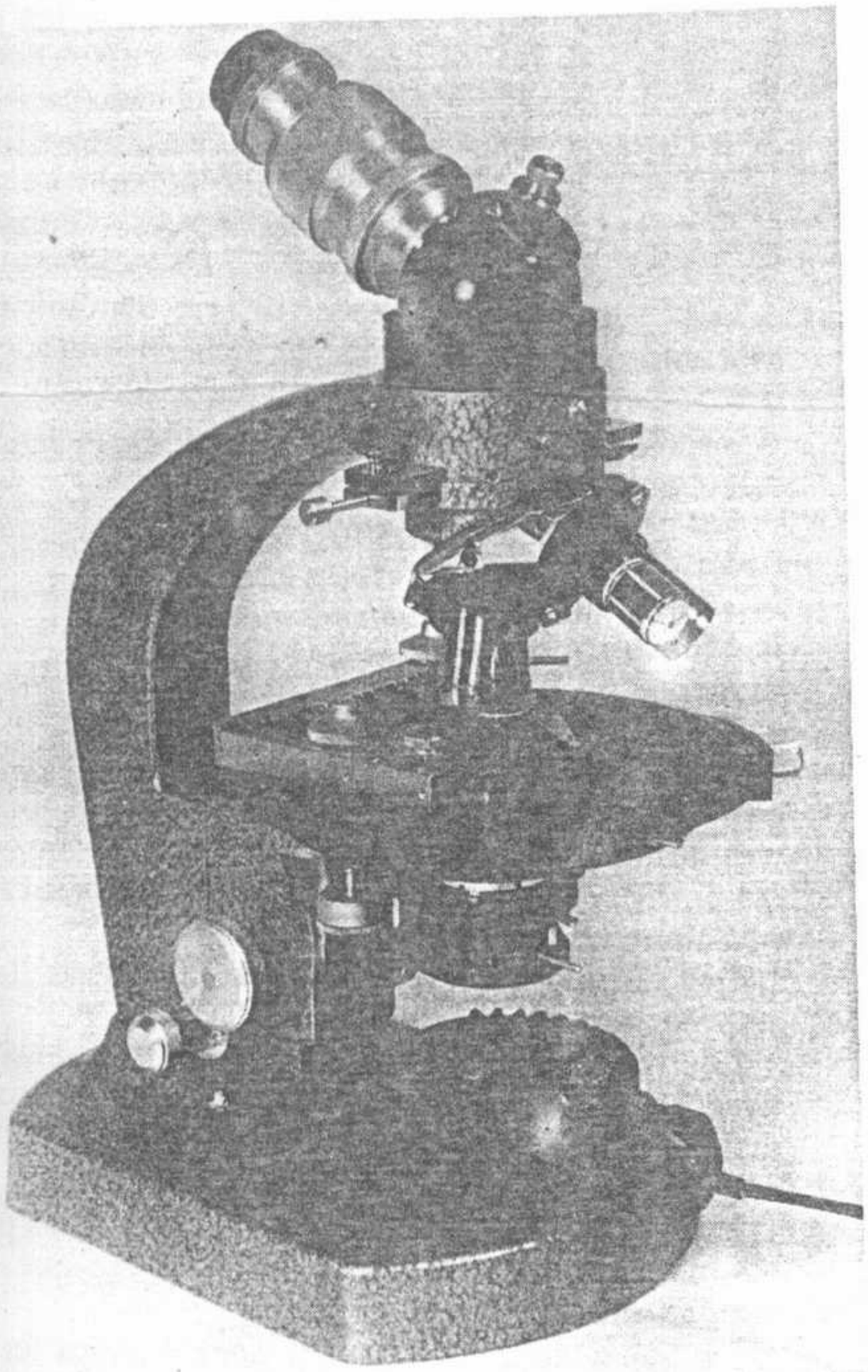


FIG. 52. — *Microscopio polarizador de trabajos prácticos BA-POL, BBT.* Obsérvese la platina giratoria regulada con un nonio, que es propia de todos los microscopios de luz polarizada, los objetivos son individualmente centrables sobre el revólver, las vías para las láminas auxiliares. Documento B. B. T. París.

observar con ningún otro método, ni por su refringencia particular, ni por la absorción de radiaciones coloreadas, ni por cualquier otro sistema tintorial.

Precauciones a tomar. — Como consecuencia de los fenómenos de absorción que se producen en los dos polarizadores, es evidente que hay una gran pérdida de luz. Hemos visto, efectivamente, cómo los rayos lumínicos se han desdoblado dos veces, al observar una estructura birrefringente entre los nícoles cruzados, por lo que únicamente llega al observador un cuarto del flujo de luz incidente. Asimismo conviene evitar cualquier luz extraña al observar con luz polarizada. Por lo que es conveniente la utilización de las pantallas mencionadas anteriormente. La mejor pantalla será la formada por una gran hoja de cartón negro, bastante alta como para esconder la cabeza del observador y presentando en su parte inferior una escotadura por la que los rayos procedentes de la fuente lumínica llegarán al espejo si la iluminación no fuera incorporada.

En casos de trabajos muy meticulosos y precisos de estructuras escasamente birrefringentes, debemos asegurarnos que ni los portaobjetos ni los cubreobjetos presenten trazas de birrefringencia. Para ello se observarán previamente con la lámina o placa de yeso o con la placa de cuarzo sensible. Raras veces puede interferir en nuestra observación la birrefringencia de los oculares o de los objetivos, dado que han sido especialmente escogidos por el constructor.

Para el estudio de los precipitados cristalinos desecados, es importante examinar una parte de ellos en seco y, la otra parte, montada en bálsamo del Canadá, dado que éste hace destacar mejor los colores de interferencia. En este caso, es conveniente contar con una pequeña cantidad de bálsamo, de manera que algunos cristales periféricos queden en el aire.

Estudio de la birrefringencia. — Instalar el polarizador, colocar la preparación sobre la platina y seguidamente poner el analizador en posición. Asegurarse del enfoque exacto entre los dos polaroides paralelos, girar el analizador 90°, de manera que los polaroides queden cruzados. En esta posición, resulta más fácil que el plano de vibración del analizador coincida con el plano sagital del microscopio; siendo perpendicular, el del polarizador se dispondrá paralelamente al plano frontal del microscopio.

Estando los polaroides cruzados, hacer girar lentamente la preparación, en el plano de la platina, alrededor del eje óptico del microscopio. Pueden presentarse en este momento dos casos. Si el microscopio está dotado de una platina giratoria, ésta *debe ser correctamente centrada:* únicamente en estas condiciones podrá utilizarse, de lo contrario, al girar la platina, el material saldrá del campo óptico. Si el microscopio no tiene platina giratoria puede hacerse girar la preparación manualmente, lo cual, a pequeños aumentos y con un poco de costumbre, no representa ninguna dificultad.

La mayoría de las platinas giratorias, denominadas centrables, son realmente difíciles de centrar. Ante todo debe efectuarse un centrado aproximado, mediante el correspondiente tornillo; seguidamente, a muy pocos aumentos debe observarse una preparación en la que se ha grabado, con tinta o con diamante, una cruz o un círculo de un milímetro de diámetro. Situar esta preparación en el centro del campo y fijarla con el nonios del carro móvil y seguidamente girar lentamente la platina. Inevitablemente el objeto sale del campo; debe mantenerse en el centro, desplazándolo con la mano y combinando estos

movimientos con los del centrado de la platina. Tras un previo tanteo, conseguimos hacer girar la platina una vuelta entera sin que el objeto se desplace del campo. Es en este momento cuando se pasará a un mayor aumento, haciendo exactamente las mismas maniobras y de esta forma se consigue mantener el centrado para todas las combinaciones ópticas. A partir de este momento no deberá accionarse el tornillo o los tornillos de centrado de la platina.

Una vez centrada la platina y la muestra giratoria situada entre los dos nícoles cruzados, pueden presentarse dos casos al efectuar la observación. Si la muestra desaparece cuatro veces y aparece otras cuatro, en posiciones distantes 45° una de la otra (lo cual puede hacerse y verificarse con el círculo graduado del analizador), evidentemente se trata de un material birrefringente. No debe olvidarse que en el caso de materiales excesivamente delgados o escasamente anisótropos la iluminación debe ser sumamente débil. Si el campo permanece oscuro durante todo el proceso giratorio, podemos considerar tres hipótesis:

1.° La estructura puede ser birrefringente pero estar mal orientada. Efectivamente, si su eje coincide con el del microscopio, se comporta como si se tratara de un cuerpo isótropo. En este caso deberá desplazarse el objeto o hacer otra preparación.

2.° El material es birrefringente, pero muy poco, insuficiente para dar una señal luminosa. En este caso deberá observarse con la lámina de yeso o con la de cuarzo sensible.

3.° Finalmente podemos considerar que el material es isótropo: el cambio de orientación y la placa de yeso dejan el campo totalmente oscuro en todas las posiciones.

Búsqueda del signo de la birrefringencia. — Tal como se ha indicado anteriormente se utiliza la lámina de yeso que da el rojo de primer orden. La birrefringencia es positiva o negativa atendiendo a que la velocidad de la marcha del rayo ordinario sea más grande (+) o más pequeña (–) que la del rayo extraordinario. En el primer caso el color sube (hacia el azul), en el segundo desciende (hacia el amarillo).

También puede determinarse, con luz convergente, el signo de un cristal uniáxico por medio de la mica de un cuarto de onda. Hay un desfase de los anillos en los cuadrantes comprendidos entre los brazos de la cruz y aparición de dos manchas negras en las proximidades del centro. Si estas manchas son paralelas a la flecha negra de la lámina de mica, el signo del cristal es negativo; si el conjunto de las dos manchas es perpendicular a la flecha, el signo es positivo.

Búsqueda de una birrefringencia débil. — Ante todo debe asegurarse la máxima iluminación de la preparación, utilizando una fuente lumínica intensa y manteniendo el condensador por encima del polarizador. Debe tenerse en cuenta que la placa de yeso da rojo de primer orden, la placa de cuarzo de tonalidad sensible, da el color violeta sensible núm. 1 de 2.° orden. Materiales con birrefringencia escasa, más o menos visibles entre los polaroides cruzados tienen, sin embargo, una acción sobre los colores proporcionados por estas láminas, denominada sensible, a causa de la facilidad con la que el cuerpo birrefringente modifica su tonalidad de polarización. Se colocan las láminas sensibles bajo el analizador, cuya montura debe ser portadora de una escotadura especial. Se hace girar el objeto y se aprecian los cambios de tonalidad; con la lámina de yeso, el rojo pasa a azul, o a amarillo; con la lámina de cuarzo, el violeta pasa a rojo o a índigo.

También puede usarse una placa de mica, denominada *mica cuarto de onda,* es decir, está tallada de tal manera que los dos rayos polarizados salen de esta lámina con una diferencia del orden de un cuarto de longitud de onda. Las diferencias de marcha, producidas por el objeto y la mica, se combinan o se vuelven a cortar como para las otras láminas sensibles, con lo que la coloración aumenta o disminuye.

Finalmente, puede obtenerse el azul de 1.er orden, superponiendo la lámina de yeso dando el rojo de 1.er orden y la mica cuarto de onda, teniendo la precaución de cruzar los ejes. Los cambios de tonalidad son bien nítidos y la observación es menos cansada que sobre fondo rojo (Amann).

Con todas estas láminas sensibles y durante la duración de una rotación completa, un cuerpo birrefringente aparece cuatro veces el color de la placa, dos veces con un color más alto y dos veces con un color más bajo.

Se sabe que para obtener la tonalidad que deben proporcionar las láminas sensibles, éstas deben orientarse en diagonal con relación a los nícoles cruzados, de manera que el eje de menor elasticidad, es decir, que corresponda al índice de refracción máximo, a 45° de planos de polarización de los polaroides. Generalmente esta dirección está marcada sobre la montura de las láminas sensibles. Para el caso de la lámina de yeso, por ejemplo, es necesario que entre los polarizados cruzados se obtenga un color púrpura intenso, que cambia en verde entre los polarizadores paralelos.

Cuerpos birrefringentes. — La birrefringencia puede ser debida a diversas causas físicas, siendo las principales:

1. La *estructura cristalina,* es decir, la orientación de las moléculas siguiendo una red tridimensional: todos los cristales, salvo los del sistema cúbico son birrefringentes.

2. La *estructura micelar* de sustancias coloidales: la orientación de las micelas pueden, en algunos casos, producir una semiisotropía, es decir, una agrupación intermediaria entre el estado cristalino y el estado amorfo, como en las fibras de colágena.

3. La *tensión molecular,* que determina que algunos cuerpos birrefringentes cuando están comprimidos o en extensión, por ejemplo, la gelatina, el vidrio y la extensión y el relajamiento en los cabellos rubios, etc.

4. La *difracción* producida por las estructuras finamente reticuladas; se sabe, en efecto, que las redes muy finas polarizan la luz. La birrefringencia de difracción desaparece cuando el objeto está situado en un medio que tiene el mismo índice de refracción.

5. La *birrefringencia de fluidos,* que se manifiesta en determinados cuerpos líquidos o viscosos, isótropos en reposo y que se convierten en anisótropos cuando se provoca la formación de las corrientes (bálsamo del Canadá, paroteínas-virus purificados, etc.).

Pleocroísmo. — Reciben esta denominación las variaciones de coloración particulares de los cuerpos birrefringentes teñidos y producidos ya no por interferencia, sino por *absorción desigual* de los rayos polarizados; siguiendo diversas direcciones dependen de la constitución óptica del objeto.

Para observar el pleocroísmo debe retirarse el analizador y únicamente se usa el polarizador. Se hace girar el material siguiendo el procedimiento anteriormente descrito y se observan los cambios de coloración.

Entre las estructuras que permiten estudiar más fácilmente el pleocroísmo, debemos citar los cristales coloreados de la zanahoria, que durante una rotación completa aparecen dos veces casi incoloros y dos veces coloreados en rojo intenso. Efectivamente, estos cristales de caroteno dejan pasar, en una dirección, casi todo el espectro y en la otra sólo dejan pasar los rayos rojos. Las paredes celulósicas, teñidas con el cloroyoduro de cinc, presentan también hermosos fenómenos de pleocroísmo.

La utilización del dicroísmo en ultravioleta y la polarización del rayo fluorescente permitieron a Ch. A. Baud la búsqueda de formas y de orientaciones de grandes agregados moleculares y de micelas y el estudio de la configuración de moléculas.

ESTUDIO DE LAS ANISOTROPÍAS BIOLÓGICAS EN LUZ POLARIZADA

Las birrefringencias de los objetos biológicos son generalmente más débiles que las de las estructuras minerales; hay además grandes dificultades para encontrar estructuras suficientemente gruesas para hacer las mediciones con mayor facilidad. Siempre deben usarse los métodos más sensibles para efectuar las detecciones y las medidas.

El condensador elíptico de Brace-Köhler (1921) es de todos los compensadores el que permite efectuar la más sencilla de las mediciones, por simple lectura de un ángulo de rotación. La lámina de mica que lo forma produce un retraso del mismo orden de aumento que el retraso a medir, generalmente de 1/20 a 1/30 de longitud de onda. El objeto debe estar orientado entre polaroides cruzados, a 45° de su posición de extinción si θ es el ángulo que debemos girar el condensador para obtener la extinción, el retraso introducido por el objeto es:

$$R = R_o \text{ sen } 2\theta; \quad R_o = \text{cte. del condensador.}$$

Si nos separamos ligeramente de la posición de compensación, el objeto aparece, o mucho más brillante o más oscuro que el fondo, atendiendo a si estamos en posición de adición o de sustracción. La constante del compensador, es decir, el retraso propio de la lámina que la forma, está determinada por estudio de un cristal de referencia de espesor y de birrefringencia conocidos.

Es a Barer que debemos el haber propuesto sustituir el analizador de un microscopio polarizador por un objetivo de contraste de fases a fin de mejorar la observación de los detalles. En un microscopio de contraste de fases, el contraste de la imagen depende de la diferencia de trayectoria óptica entre el objeto y el medio que lo rodea. Si el índice depende de la orientación de la luz polarizada incidente, el contraste variará atendiendo a esta orientación. De esta manera, se detecta lo que Locquin denomina «dicroísmo de fases».

Para poner en práctica este método, debe disponerse de un microscopio de contraste de fases, construido como un microscopio de luz polarizada, es decir, provisto de una platina graduada, giratoria y centrable, pero también y sobre todo de una óptica absolutamente sin tensiones y cuidadosamente tratada contra los reflejos. Podemos comprobar que todas estas condiciones se cumplen cuando entre los polaroides cruzados el fondo aparece muy negro, pero con una iluminación muy intensa. A diferencia de la polarización que detecta las extinciones bien de máximas o mínimas de brillo de una parte y otra de la extinción, el dicroísmo de fases no se traduce más que por desigualdades de contraste con relación al gris medio del fondo sin objeto. Estas variaciones son poco apreciadas por el ojo, es por lo que Barer utilizaba un fotómetro muy sensible para efectuar sus mediciones. Locquin ha propuesto combinar, hasta cierto punto, el método del

«punto gris» de Shinya Inoué (1951) con el de Barer, proyectando la imagen de una lámina birrefringente compuesta, llevando dos láminas de 1/20 de onda juntas, cuyos ejes forman entre sí un pequeño ángulo. La imagen de esta lámina se proyecta con luz polarizada mediante un dispositivo acromático, bien corregido para la aberración esférica, sin tensiones y sin espejo en la trayectoria de los rayos luminosos (despolarizan parcialmente el haz). Alcanzado un determinado nivel de contraste, se sustituye sobre la mitad del objeto en herradura sobre la línea de separación de la lámina formada por Locquin, la apreciación de la máxima separación de contraste o su igualdad atendiendo a si se trabaja sobre materiales birrefringentes o no. Este método tiene la ventaja de eliminar todas las fuentes de errores debidas a las imperfecciones del sistema óptico utilizado, pero subsisten en tanto que elevatrices del umbral de sensibilidad, lo cual es menos grave. La lámina compuesta de Locquin puede estar evidentemente formada por dos láminas de semionda de 45° lo cual da dos medias imágenes polarizadas en ángulo recto. Con los condensadores elípticos las dos medias imágenes están en una posición de adición y otra de sustracción, simétricas con respecto a la posición exacta de la compensación. Con el compensador Macé de Lépinay, tenemos el análogo de un doble condensador elíptico de valor continuamente variable.

Cuanto más débiles son las birrefringencias a medir más absorción de fase debe tener la placa de fases.

Las birrefringencias de los cuerpos cristalizados son tratadas en profundidad en las obras especializadas de mineralogía y de cristalografía. Las birrefringencias biológicas hacen aparecer nuevos tipos de estructuras desconocidas en el dominio inorgánico. Cuanto más homogéneos sean los cuerpos cristalizados su birrefringencia no dependerá del medio en el que se encuentran; presentan una birrefringencia intrínseca o primaria.

Las estructuras biológicas son heterogéneas, sus micelas o grandes macromoléculas, están separadas por meatos o por sustancias de otra naturaleza. Se embiben del medio en el que se encuentran y si las micelas están geométricamente orientadas, con un espacio pequeño con relación a la longitud de onda de la luz utilizada, se aprecia una birrefringencia estructural. Si las micelas están cristalizadas, su birrefringencia primaria se superpone a la birrefringencia estructural, lo cual da una birrefringencia compleja. Se estudian estos tipos de birrefringencias sumergiendo los materiales en líquidos de índice de refracción creciente y de valor conocido. La birrefringencia estructural se anula cuando el líquido de inhibición tiene un índice igual al de las micelas cristalinas.

Clasificamos en seis categorías las birrefringencias biológicas, con una evocación de su infraestructura. Debemos recordar que los microscopios electrónicos han confirmado totalmente los esquemas establecidos a partir de los estudios llevados a cabo con luz polarizada, sobre todo para las estructuras «foliáceas» frecuentes en la superficie de las esporas y de los granos de polen:

Fibrosas - Anilladas - Helicoidales - Tubulares - Foliáceas - Esféricas.

Las *estructuras fibrosas* tienen sus micelas orientadas siguiendo el mayor eje del objeto, con una regularidad casi cristalina. Longitudinalmente la extinción es derecha, transversalmente no aparece la cruz de extinción negra.

Las *estructuras anilladas* se trata del caso opuesto al anterior: la orientación de las micelas es perpendicular al gran eje. Longitudinalmente la extinción es derecha pero negativa con relación al largo en un medio de escaso índice, transversalmente dan la imagen de una cruz negra.

Las *estructuras helicoidales,* frecuentemente mal denominadas espiraladas, no tienen extinción total; por el contrario, una sección transversal o una semifibra en el sentido longitudinal tienen una extinción oblicua.

Las *estructuras tubulares* son estructuras helicoidales de textura foliácea.

Las *estructuras foliáceas* tienen una extensión derecha en una o dos direcciones, pero son estadísticamente isótropas, es decir, sin extinción en una tercera, que siempre aparece paralela a su superficie. Se trata de estructuras orientadas por laminación entre dos capas límites, pero que no quedan orientadas en su plano.

Las *estructuras esferoidales* presentan los fenómenos de la cruz negra, negativa o positiva atendiendo a la disposición de las micelas, radial o concéntricamente ordenadas. Estas distintas categorías derivan unas de otras atendiendo al siguiente esquema que permite recordarlas fácilmente:

isótropo → foliáceo → tubular →

→ helicoidal → anillada → esferoidal negativa

→ helicoidal → fibroso → esferoidal positiva

Ello se debe en gran parte a que las micelas están laminadas entre dos superficies limitantes, organizándose una estructura isótropa en una estructura foliácea. Esta laminación, hecha sobre un cilindro, da una estructura tubular. Un alargamiento de este cilindro, con torsión, da una estructura helicoidal. Una compresión axial da una estructura anillada, mientras que un gran alargamiento conduce a una estructura fibrosa. La reducción del cilindro a una esfera da una estructu-

ra esférica positiva o negativa, atendiendo que provenga de una u otra de estas dos estructuras derivadas.

ESTRUCTURAS EN CONTRAPLACADO Y EN MOSAICO

Cuando los estratos superpuestos y orientados de una membrana forman un ángulo constante, uno con respecto al otro, se dice que tenemos una estructura «en contraplacado». Estas estructuras fueron particularmente estudiadas por Bouligand (1980). Cuando el ángulo que forman las orientaciones de los estratos es de 90°, dicha estructura no puede distinguirse al observarla en luz polarizada de una estructura isótropa. Sin embargo, en general, si se hincha un estrato mediante un agente apropiado, la birrefringencia aparece por efecto diferencial. Es normal que el hinchamiento de una estructura biológica anisótropa vaya acompañado de una disminución de su birrefringencia.

Las estructuras en mosaico son aquellas cuya anisotropía varía por placas, perfectamente visibles, además, con el microscopio electrónico de barrido.

DICROÍSMO METACROMÓTROPO

Cuando las micelas de una estructura anisótropa están inmersas en una matriz isótropa, en ciertos casos es posible diferenciar los componentes, estudiando su metacromasia con luz polarizada, si uno de los componentes es metacromótropo en uno de los colorantes metacromáticos. Locquin y Venac-Peyré (1979) han desarrollado, basándose en este hecho, una técnica denominada «dicroísmo metacromótropo». El objeto teñido metacromáticamente es observado entre nícoles cruzados; la matriz isótropa aparece de color azul mientras que las micelas orientadas aparecen de color rojo intenso, debido a una conveniente orientación del objeto con respecto al plano de polarización.

MICROSCOPIA POR FLUORESCENCIA O FLUOROMICROSCOPIA

La fluoromicroscopia se basa en el hecho de que determinadas estructuras al ser intensamente iluminadas por radiaciones de escasa longitud de onda, la absorben, emitiendo seguidamente radiaciones de longitud de onda más largas, denominadas de fluorescencia (fig. 53), se trata del efecto Stokes. Para evidenciar correctamente y con toda su intensidad estas fluorescencias debe delimitarse claramente con un primer filtro coloreado cuál es la banda de excitación, generalmente es la ultravioleta o la del azul-violeta, y seguidamente disponer, tras el objeto, un segundo filtro, «filtro de intercepción», que corta lo que pueda quedar de la luz excitadora a fin de no dejar pasar más que la fluorescencia. El procedimiento puede mejorarse mediante distintos artilugios ópticos. Se ilumina el material que debe ser excitado en fondo negro a fin de evitar que la luz directa penetre en el objetivo; el mejor de los fondos negros que pueda aplicarse en este caso es un «fondo negro central» y se consigue utilizando el objetivo de Spierer-Locquin con pastilla central opaca. También puede iluminarse el objeto por encima (epiiluminación), a través del objetivo o con un epiiluminador. En los catálogos de los constructores de microscopios encontramos esquemas muy aclaradores de estos diversos dispositivos (fig. 54).

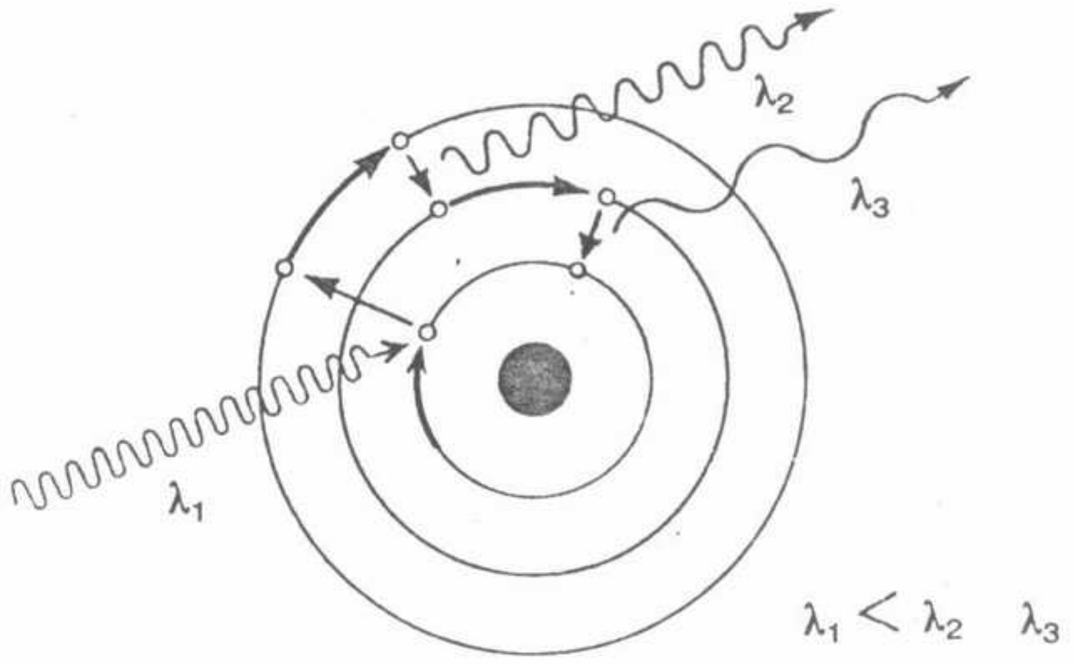


FIG. 53. — *Principio cuántico de la fluorescencia.* Una radiación incidente de longitud de onda corta λ 1 excita un electrón en la nube electrónica que rodea el núcleo del átomo situado en el centro. La energía absorbida por el electrón lo propulsa (excita) hacia las capas periféricas de la nube, de donde volverá a caer por saltos cuánticos, emitiendo cada vez una radiación de fluorescencia de mayor longitud de onda λ 2 después λ 3. Documento Wild-Heerbrugg.

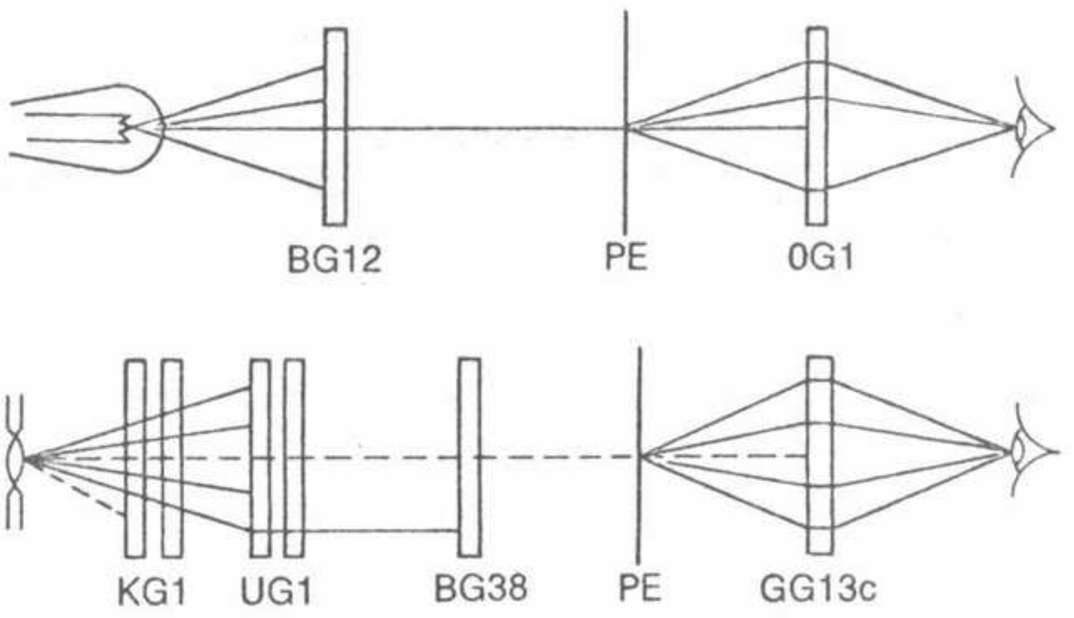


FIG. 54. — *Principio de la observación con fluorescencia.* En la parte superior con luz azul, abajo con luz U. V. — KG1 filtro anticalórico, UG1 filtro UV, BG 38 filtro azul cortando el rojo, PE plano del objeto, GG13c filtro reteniendo el UV, BG12 filtro azul, OGl filtro naranja de freno del azul.

Debe mencionarse que en general los objetivos utilizados para la observación fluoroscópica deben haberse seleccionado de manera que carezcan de fluorescencia propia a nivel de sus lentes, así como a nivel del bálsamo que en ocasiones se usa para pegar las lentes que forman los objetivos. Debe tenerse en cuenta que el medio de montaje de las preparaciones, así como el líquido de inmersión, carezcan de fluorescencia natural. Será conveniente comprobar estos detalles utilizando una preparación testigo, que carezca de elementos fluorescentes. Algunos colorantes fluorescentes actúan en dosis muy pequeñas. La máxima limpieza, así como el mayor cuidado posible son recomendados para evitar los «parásitos».

En ocasiones, a la observación directa en contraste de fases se asocia la fluoroscopia, principalmente para poder localizar de forma muy precisa los puntos fluorescentes en las células o en los tejidos (fig. 55).

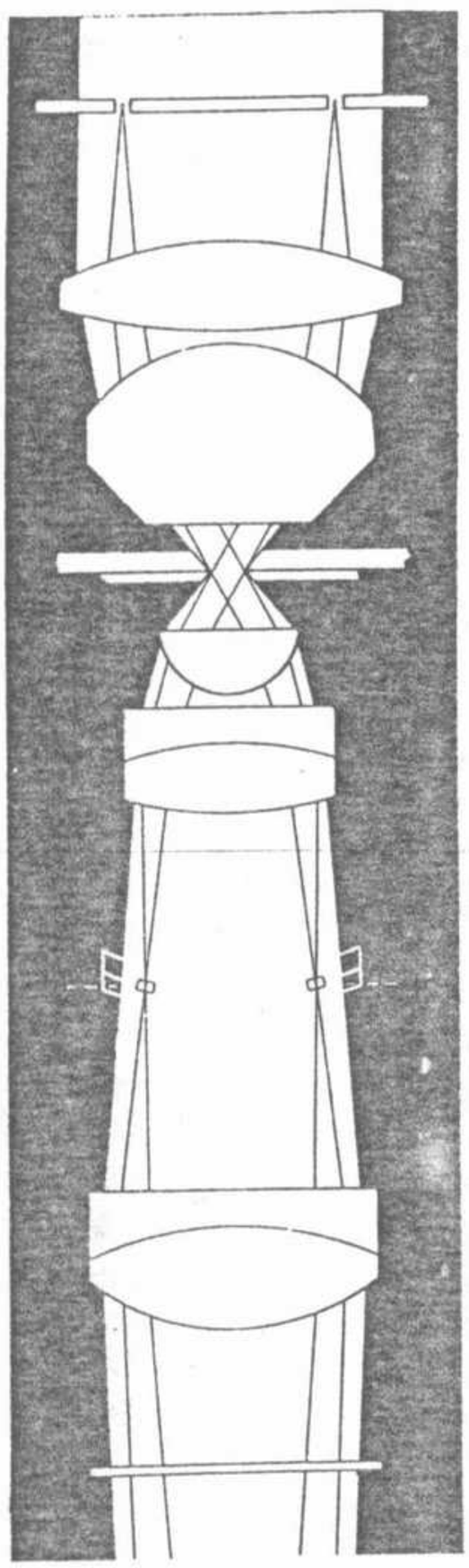


FIG. 55. — *Trayectoria de los rayos en un microscopio mixto: Contraste de fase y fluorescencia.* El interés del método consiste en la superposición a la imagen de fluorescencia de una imagen de detalles de estructuras de otro color. Documento Leitz-Wetzlar.

Debemos mencionar también la observación en polarización del rayo fluorescente, bien sea que polaricemos el propio rayo de excitación o bien que analicemos con un analizador la polarización del rayo de fluorescencia. Ch. A. Baud y posteriormente Locquin han demostrado que en ambos casos puede deducirse una orientación de las micelas a lo largo de la cual el fluorocromo se fija.

La microfluoroscopia se denomina «primaria» cuando son las propias estructuras que poseen fluorescencia, se dice que es «inducida» o «secundaria» cuando un colorante se deposita selectivamente sobre una estructura y le confiere su fluorescencia. Cuando esta fijación de un colorante fluorescente o «fluorocromo» se hace con un anticuerpo marcado se habla de la técnica de la inmunofluorescencia, muy utilizada en inmunohistoquímica. Técnica relativamente reciente y que ha posibilitado gran parte de los estudios inmunológicos llevados a cabo hasta el momento.

De esta manera hemos delimitado las tres variantes fundamentales de la microfluoroscopia.

El marcado específico con los fluorocromos. Es la base de la inmunofluorescencia. Se sabe que la «inmunidad» es una defensa adquirida por un organismo vivo, mientras que la «resistencia» es propia e innata. Se distingue la inmunidad activa, obtenida inyectando directamente en el organismo las toxinas atenuadas o el propio agente patógeno atenuado y la inmunidad pasiva es la que se obtiene inyectando a un organismo anticuerpos formados en otro organismo. En ambos casos se denominan «antígenos» las sustancias que provocan una reacción defensiva del organismo y «anticuerpos» las sustancias inducidas para combatirlas. La inmunidad, bien sea activa o pasiva, tiene como consecuencia provocar aglutinaciones, precipitaciones o diversas reacciones. Una de éstas ha sido utilizada en la práctica para poder efectuar el «marcaje» de los antígenos por parte de los fluorocromos. Podemos marcar tanto los antígenos como los anticuerpos; puesto que interviene acoplamiento de los dos componentes, las moléculas a las que se han enganchado un colorante fluorescente para marcarlas se fijan selectivamente sobre su complemento y de esta forma lo ponen de manifiesto mediante una fluorescencia intensa, fácilmente obtenida y fácil de reproducir. Si se utiliza un suero que contenga anticuerpos específicos del antígeno buscado se obtiene una reacción directa de inmunofluorescencia; también pueden desenmascararse antígenos ya acoplados a su respectivo anticuerpo, utilizando un método indirecto.

El aspecto serológico técnico es sumamente importante, no vamos a tratarlo en este momento, remitimos al lector a obras especializadas sobre este tema. Sin embargo, las cuestiones re-

ferentes al fluorocromo, dado que pertenecen al dominio de la micrografía de manera muy específica, las desarrollaremos en la página 192.

El mismo principio se aplica en microscopia electrónica, en que el marcaje puede conducir a una auténtica fluorescencia electrónica en aquellos aparatos que llevan un equipo especial para detectar los electrones de fluorescencia o bien por los mecanismos que determinan un aumento de contraste, como en el caso de la técnica de la inmunoferritina.

INMUNOFLUORESCENCIA

Kaplan y Kraft (1965) utilizaron la inmunofluorescencia para demostrar la presencia de hongos parásitos y patógenos en los tejidos humanos. Pusieron de manifiesto las células fúngicas por digestión previa con tripsina al 1 %, tras fijación con formol, obtención de los cortes y montaje sobre portaobjetos. La coloración se hace con un fluorocromo unido a una antiglobulina de las células a estudiar, tales como de *Blastomyces, Coccidiomyces* o *Cryptococcus*.

Esta misma técnica puede utilizarse para tratar material destinado a ser observado con el microscopio electrónico, marcando la antiglobulina con plomo o utilizando un aparato equipado para la detección de electrones de fluorescencia, o intensificando los contrastes con el método de la inmunoferritina.

CATODOLUMINISCENCIA

Hay diversas fuentes de información que pueden ser emitidas por un objeto al ser bombardeado por un haz de electrones: rayos X, electrones Auger, electrones difractados, electrones difusos, catodoluminiscencia. Algunas de estas informaciones dependen de los componentes atómicos de las estructuras, otras dependen de las redes cristalinas y finalmente hay otras que actualmente tienen una compleja interpretación.

La catodoluminiscencia es excitada a baja presión por un haz de electrones. Debe reducirse la interacción con el objeto utilizando una energía cuanto más débil mejor y haciendo un barrido rápido. Los fotones secundarios emitidos por la superficie son difractados y esto determina obtener únicamente una resolución del orden de las 10 μm. La catodoluminiscencia o preferentemente la electroluminiscencia de Locquin (1981) tiene aplicaciones potenciales importantes en citología y en histología sobre células fijadas o para la localización de estructuras poseedoras de fluorescencia natural en las células vivas. El acoplamiento con un espectrógrafo permite efectuar un análisis espectral cualitativo de los componentes fluorescentes.

MICROELECTROLUMINISCENCIA

En lugar de excitar la fluorescencia con luz ultravioleta, Locquin (1981) propuso una excitación eléctrica. Para ello la muestra se pone en contacto con una emulsión fotográfica por un lado y por el otro con un electrodo plano. Este electrodo emite un campo eléctrico alternativo en alta tensión. El tiempo de exposición es de escasos segundos. Al revelar la emulsión fotográfica se obtiene una imagen análoga a una microautorradiografía, imagen que tras haber aumentado considerablemente se observa al microscopio. De esta manera, pueden localizarse compuestos fluorescentes intracelulares, sin tener que haber sometido el material a una fijación previa y sin deterioro de las células.

DOBLE FLUORESCENCIA

Los fluorocromos que provocan un dicroísmo pueden inducir un cierto dicroísmo de fluorescencia. Este fenómeno únicamente se observa con un ocular polarizador. Las estructuras dicroicas teñidas polarizan la luz y son visibles cuando el plano de polarización es paralelo al del ocular polarizador. Para evidenciar de forma correcta e intensa el dicroísmo en fluorescencia, puede utilizarse el amarillo de Thiazolio que da una fluorescencia amarilla intensa sobre un fondo azul que aparece a los 90°. La doble fluorescencia, así como la tinción por dispersión diferencial, depende del índice de refracción del medio en el que está montado el material. Clerici recomienda una solución acuosa de formato o malonato de talio, cuyos índices de refracción están comprendidos entre 1,35 y 1,75.

DEBILITAMIENTO O AMORTIGUAMIENTO DE LAS FLUORESCENCIAS

Es interesante indicar que el yodo debilita la fluorescencia de las moléculas, salvo la del ADN nuclear y que la plata debilita las fluorescencias internas del ADN. De esta manera se dispone de un método de localización, hipersensible, de los compuestos fluorescentes nucleares.

TELEMICROSCOPIA

Un telemicroscopio es un aparato que transporta la imagen que sale del microscopio a una cierta distancia, pudiendo llegar de unos centímetros a varios centenares de metros. Tres grupos de factores se requieren para poder efectuar este traslado de la imagen microscópica.

A) Los **vehículos ópticos** tales como los usados

en los periscopios principalmente eficaces cuando el microscopio funciona en un recinto radiactivo.

B) Los transportes de imagen por **fibras ópticas**, coherentes, flexibles, que tienden a sustituir los dispositivos anteriormente mencionados, dado que su flexibilidad permite separarlos fácilmente y mecánicamente del receptor.

C) Las **cámaras de televisión** denominadas de circuito cerrado, dado que la unión entre el emisor y el receptor se hace por hilo. Este último equipo es el más ventajoso, porque permite receptores múltiples, en una misma sala o en salas diferentes. La misma cámara puede utilizarse como cámara normal para transmitir escenas de manipulaciones o como macrocámara para transmitir grandes planos de pequeños objetos.

Las cámaras deben funcionar preferentemente en una posición próxima a la horizontal, para evitar choques o vibraciones que podrían desprender minipartículas del interior del tubo sensible y marcan el tubo de manchas que destruyen la imagen en aquella zona. La mayoría de los constructores de microscopios han previsto adaptaciones mecánicas adecuadas y convenientes. El usuario deberá escoger la óptica adecuada. Digamos que en general con el tubo de la cámara, teniendo un formato útil igual al de la cámara de películas de 16 mm deben utilizarse aumentos sobre la superficie sensible comparables, recordando en todo caso que la definición de la película es muy superior a la de un vidicon que equipa las cámaras corrientes de televisión. Esta generalmente es de 20 trazos por milímetro. Si se calcula el poder separador de las líneas por milímetros de los principales objetivos, dividiendo por 20 el valor correspondiente al objetivo utilizado se obtiene directamente el aumento óptimo sobre el tubo del vídeo, por ejemplo 200 para un objetivo de inmersión de abertura numérica 1,20 y 40 para un objetivo de 10× y de abertura numérica de 0,25. Vemos cómo, en general, son aumentos cinco veces más pequeños que los que utilizamos en fotomicrografía o en la observación directa. Aumentos tan débiles necesitan ser obtenidos con oculares de muy pocos aumentos, cortos y con una lente correctora. El observador, para poder captar todos los detalles de la imagen sobre la pantalla de recepción debe estar a una distancia óptima de la pantalla de 7 veces su anchura. Si está demasiado cerca, su vista se ve afectada por las líneas de barrido de la imagen, si se pone demasiado lejos pierde poder separador, dado que el ojo únicamente puede apreciar detalles separados por un ángulo de menos de dos minutos. Esta limitación del propio ojo es la misma que se presenta en el caso de observar una imagen directamente proyectada por el microscopio sobre una pantalla, pero en este último caso, no se debe a una limitación del intermediario y, en principio, el aumento del ocular es escogido en función de la distancia de proyección deseada.

Homólogos a los magnetófonos de bandas magnéticas para el registro de los sonidos, existen «magnetoscopios» para registrar imágenes que salen directamente de la cámara. Existen tanto para el negro como para las imágenes de color. Tienen tres aplicaciones principales en microscopia:

— permiten conservar y recibir indefinidamente imágenes poco frecuentes o fugitivas;
— permiten montajes, con supresión de longitudes o de secuencias inútiles;
— colocadas paralelamente a la cámara de filmación, haciendo una instalación cinemicrográfica, permiten captar rápidamente unas determinadas imágenes, un control visual de la secuencia filmada antes de revelar la película.

Los tubos de televisión tienen una gran superioridad sobre la calidad de las imágenes recogidas directamente por el ojo o por las películas: son muy sensibles a pesar de hacer iluminaciones sumamente débiles. De esta manera, la muestra no recibe una cantidad excesiva de luz o un exceso de calor que pueda alterar su comportamiento o que pueda decolorarla en el caso de que estuviera teñida.

Un sistema electrónico regula automáticamente el nivel de amplificación lumínica, lo que frecuentemente permite regular el contraste con el diafragma del condensador sin tener que retocar el grado de iluminación global.

A título de ejemplo digamos que habitualmente puede lograrse una variación de iluminación de 1 a 20 sin que ello influya sobre la imagen y que el nivel medio de iluminación sobre el tubo puede ser 4000 veces más débil que para la fotomicrografía con el mismo objetivo.

Cuando un tubo de televisión ha sido iluminado por un impacto luminoso demasiado fuerte se constatan irregularidades de sensibilidad en su superficie, lo cual se traduce por la presencia de trazos alternativamente claros y oscuros sobre la imagen. En este caso debe apagarse el sistema de iluminación del microscopio y dejar la cámara bajo tensión durante algunos minutos o algunas horas hasta que recupere su sensibilidad inicial. Si esta precaución no es tomada en consideración se acorta considerablemente la duración de vida del tubo.

Cuando en la imagen se observa una mancha muy brillante con un halo oscuro, se hará desaparecer disminuyendo la intensidad de la iluminación o actuando sobre el botón de regulación del «vídeo» del fotocátodo.

IV. — TOMA DE IMÁGENES

LA FOTOMICROGRAFÍA

La costumbre ha designado el nombre de «fotomicrografía» para denominar la fotografía obtenida con el microscopio y «microfotografía» para designar la microcopia fotográfica de documentos. Sin embargo, estos dos términos se utilizarán aplicándolos incorrectamente en múltiples textos. Felizmente sólo hay diferencias de matiz y las dos técnicas tienen muchos puntos comunes.

Durante muchos años la fotomicrografía a grandes aumentos ha planteado numerosos problemas, y principalmente se ha encontrado frente a tres obstáculos: la poca potencia de las lámparas de iluminación, la falta de sensibilidad de las emulsiones contrastadas y la falta de estabilidad de los equipos microscópicos. Los progresos obtenidos en estos últimos años en los tres dominios han permitido obtener equipos compactos y muy versátiles (fig. 56).

Sea cual fuere el aparato utilizado, el operador, una vez instalado el aparato y sus accesorios, debe asegurarse de que no existan vibraciones. Deben estar ausentes por lo bien montado que se ha dejado el instrumento o por haberlo montado sobre una base antivibratoria, que lo aísla de su contorno. La eliminación de las vibraciones cuando se instala depende en gran parte de la construcción, del diseño del aparato, pero también del entorno. Si el laboratorio se encuentra en una gran ciudad o cerca de una carretera es prácticamente imposible que las paredes del inmueble no vibren con el paso de los metros o de los camiones. Es importante aislar el equipo fotomicrográfico del edificio mediante filtros de frecuencias. El mejor filtro de frecuencias es un saco de arena fina y seca de 15 cm de grosor sobre el que destaca una pesada placa de cemento o de hierro que no toque por ningún lado la pared. Los fieltros amortiguadores, las planchas de caucho y todos los dispositivos que puedan encontrarse en el comercio y vendidos como amortiguadores y como filtros de frecuencia no pueden siquiera compararse, en eficacia, con los sacos de arena.

Algunas vibraciones son producidas por el propio equipo de microfotografía y no pueden eliminarse del todo. Citemos por ejemplo el abatimiento de los espejos en las cámaras réflex o la aceleración de partida o el cese del obturador de pantalla. Es por ello que en todos los casos que se trabaja a muy grandes aumentos, recomendamos utilizar tiempos de exposición muy cortos, inferiores a 1/50 de segundo, o utilizar poses largas de más de dos segundos. En el primer caso, las vibraciones mecánicas que tienen un período más largo no son molestas, en el segundo caso, son amortiguadas durante una pequeña fracción inicial de tiempo de exposición y no afecta para nada a la imagen.

La elección de los equipos. — Para escoger un equipo se tendrán en cuenta las siguientes variables:

— en principio, la frecuencia de tomas de fotografías con relación a las observaciones;

— seguidamente, la homogeneidad o no de las imágenes que deben fotografiarse, es decir, la

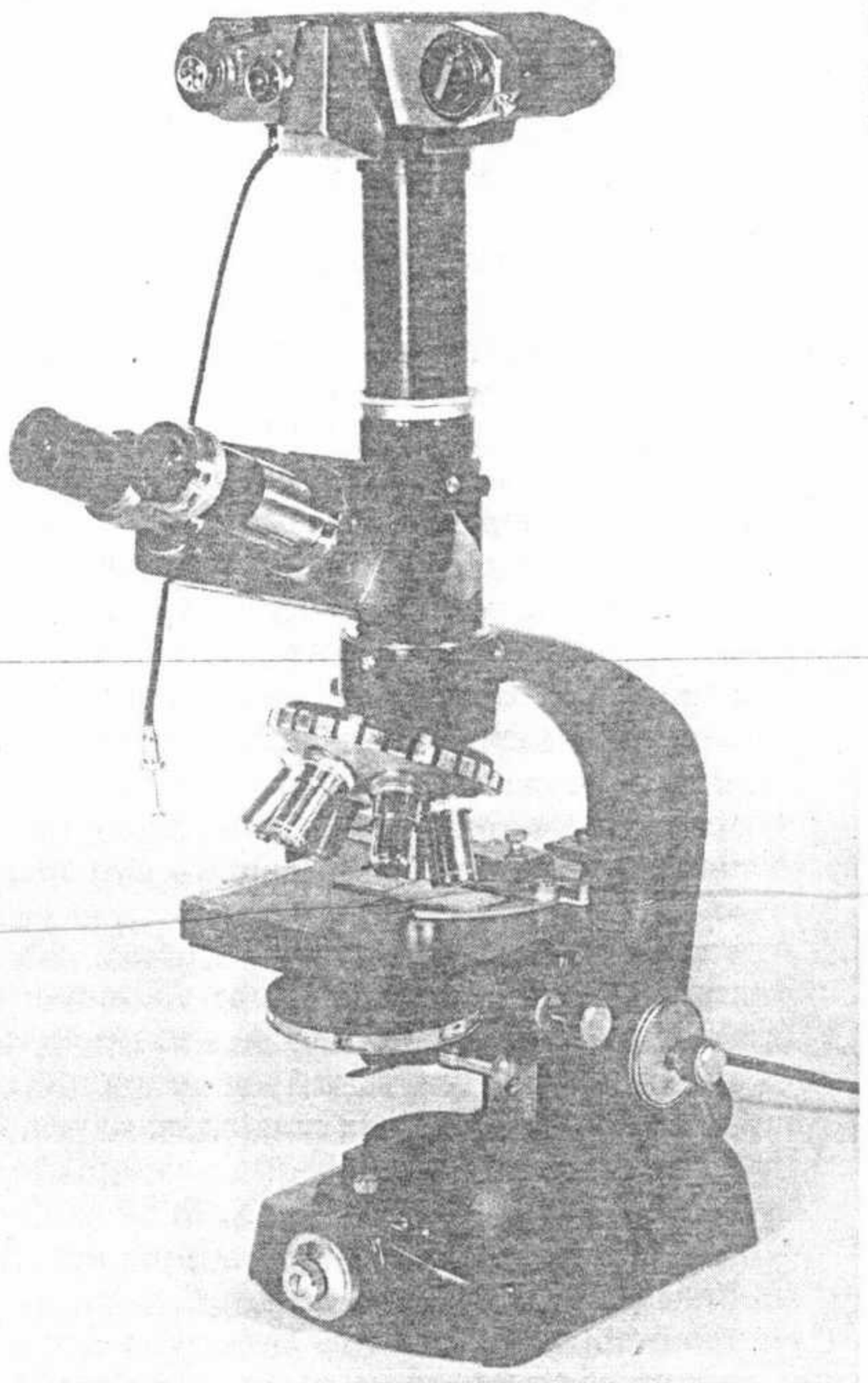


FIG. 56. — *Microscopio de investigación Diamirex BBT con equipo fotográfico y contraste interferencial.* Documento BBT, París.

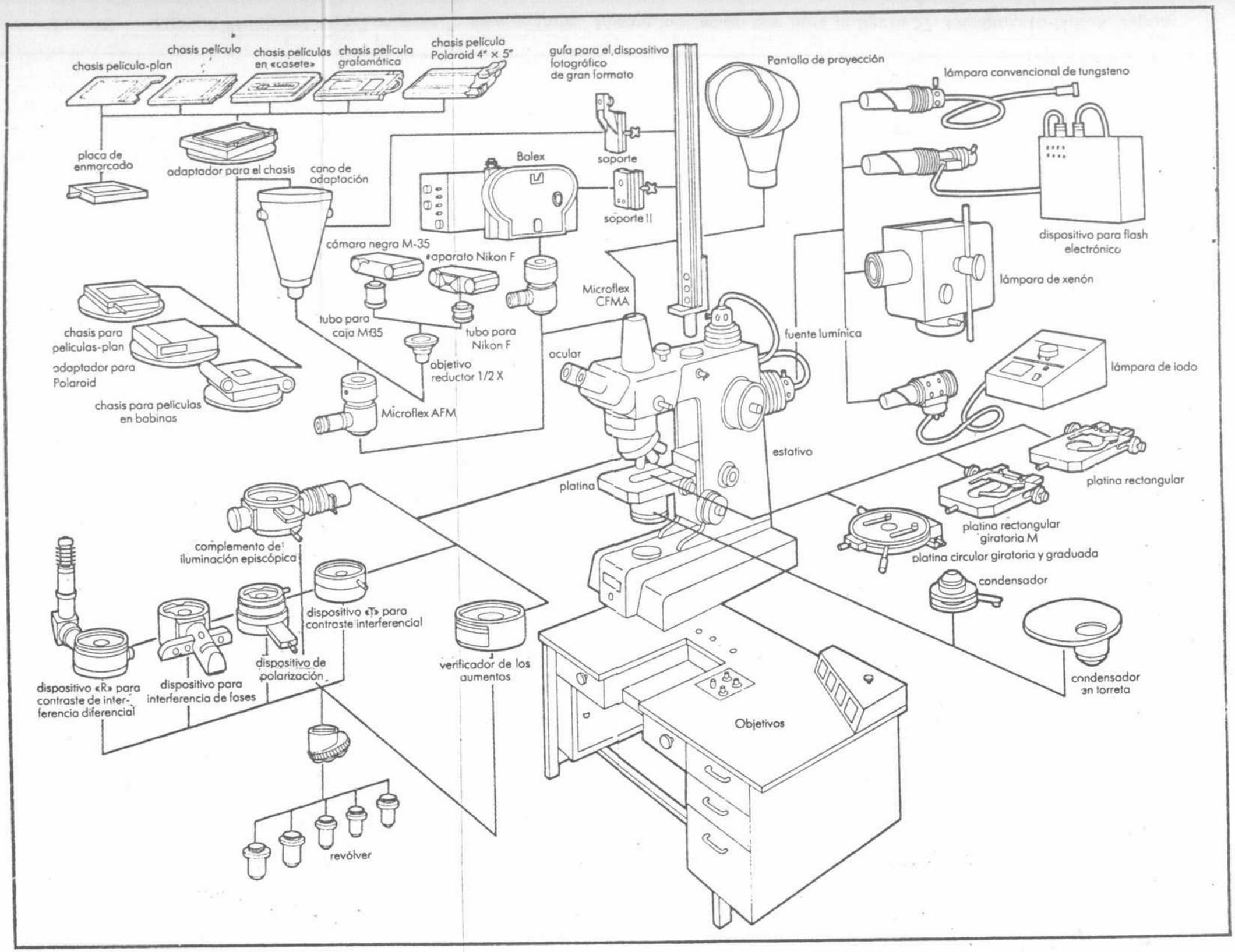


FIG. 57. — *Sistema Apophot de Nikon.* Alrededor del microscopio, situado en el centro, se hallan representados todos los accesorios que pueden incorporarse a él, bien sea opcionalmente algunos de ellos. Cuando los accesorios están relacionados por varias líneas significa que son intercambiables, pero no pueden ser utilizados simultáneamente. Documento Nikon, Japón.

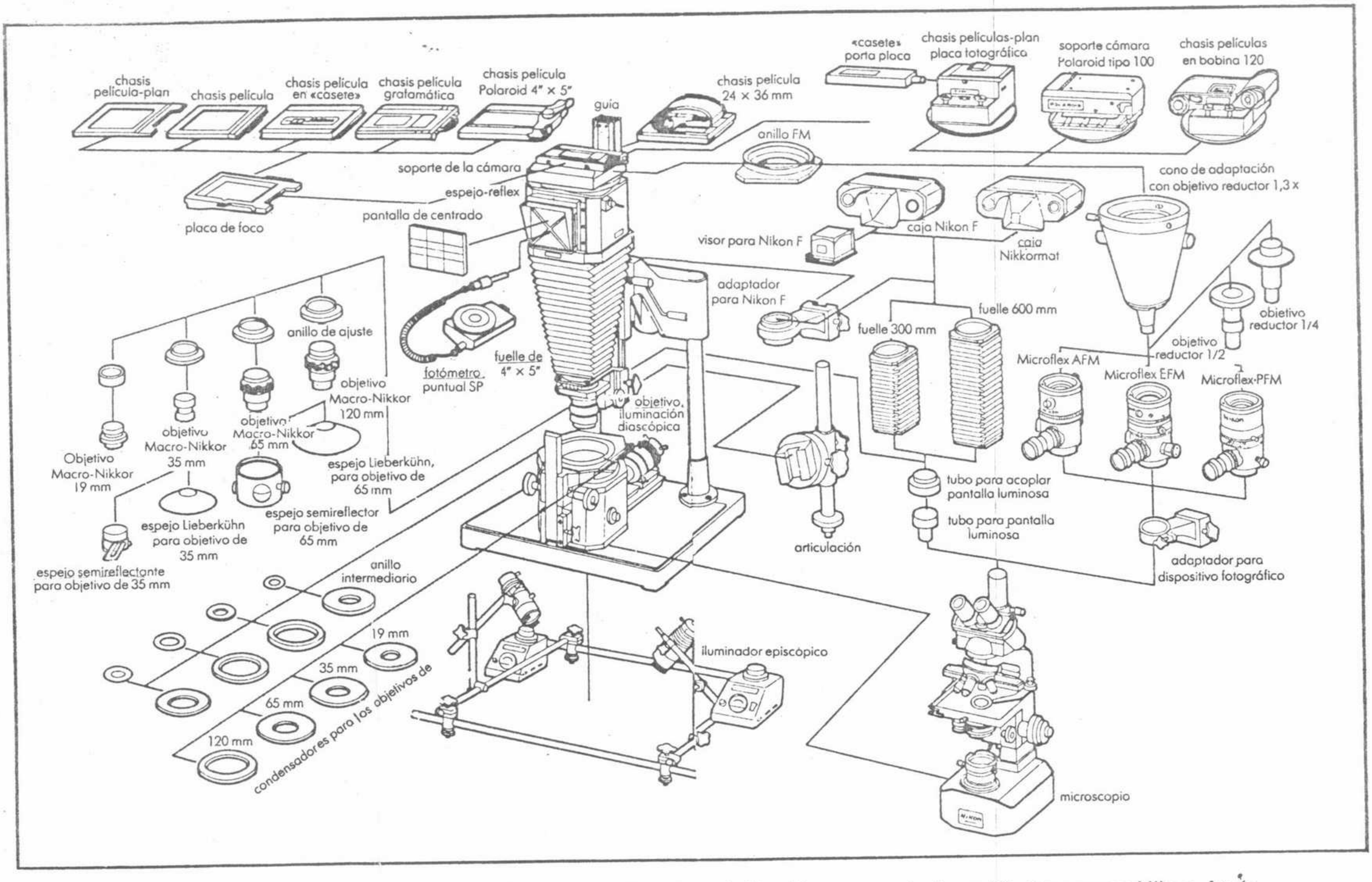


FIG. 58. — *Sistema Multiphot de Nikon para fotomacrografía.* Misma indicación que para la figura 57. Documento Nikon, Japón.

mayor o menor variedad de materiales observados, de las tinciones empleadas, de los aumentos de trabajo.

Si la frecuencia con que se fotografía es pequeña con respecto al número de observaciones, podremos acomodarnos con un aparato que instalaremos cada vez que vayamos a hacer una fotografía. Pero si debemos hacer muchas fotografías en el transcurso de una observación microscópica, debemos tener la posibilidad de mirar y fotografiar seguidamente de la manera más rápida y cómoda posible, por lo que el equipo microfotográfico deberá ser estable y lo más automatizado posible.

De poderse estandarizar las tomas de imágenes, es decir, que si los materiales estudiados son muy homogéneos con respecto a los tres parámetros siguientes: su naturaleza, su tinción y los aumentos de observación, saldrá muy a cuenta trabajar siempre con el mismo sistema de iluminación, el mismo filtro, con la misma emulsión y con iluminación constante, la célula fotoeléctrica encontrará en estos casos prácticamente las mismas condiciones operatorias.

Para la elección de sistemas de iluminación remítase a la página 15.

Para la elección de la óptica véanse las figuras 12 y 13.

Cuando se trata de fotografiar una preparación debe tenerse en cuenta con mayor rigurosidad unas recomendaciones que hemos dado para la simple observación directa. Máxima limpieza de las superficies ópticas, de la propia preparación, gran homogeneidad del sistema de iluminación. Todos los centrados deben verificarse, comprobarse con sumo cuidado, siguiendo el orden establecido a continuación: centrado del filamento con relación a su colector, del haz luminoso con respecto al diafragma iris del condensador, el centrado de éste con respecto al objetivo, del diafragma de campo con respecto al campo fotografiado, de los anillos de iluminación con respecto a la placa de fases, de la cámara con respecto al ocular del microscopio. Los enfoques deben hacerse cuidadosamente. Inicialmente, debe enfocarse el condensador que debe proyectar una nítida imagen del diafragma de campo en el plano del objeto a fotografiar, seguidamente enfoque del ocular fotográfico comprobando la disposición del retículo de enfoque y comprobar el encuadre, finalmente enfoque de la preparación. No sabríamos aconsejar el enfoque «paraláctico» para evitar que el ojo del observador no se acomode falsamente según la imagen que observe. El principio en el que se basa este enfoque es el siguiente: si la imagen del objeto está en el mismo plano que el retículo del encuadre, éste correctamente enfocado, ningún desplazamiento lateral del ojo detrás del ocular produce desplazamiento del uno con respecto al otro. Para verificarlo basta oscilar ligeramente la cabeza delante del visor: la imagen del objeto permanece fija con relación al retículo, siempre y cuando el enfoque sea correcto.

Antes de la utilización de cualquier equipo es aconsejable verificar:

— la ausencia de luz parásita formando un halo o un punto central sobreexpuesto en la imagen; para ello, una vez efectuados todos los centrados sobre un objeto real se quita y se observa el interior del tubo del equipo, habiendo quitado previamente el ocular. Si se aprecian reflejos sobre el anillo de fijación del revólver, o en el interior del tubo, se reformará el aparato;

— la correcta nitidez del «humor vítreo del ojo» ocular en función de la obtención de imágenes. Si la cámara es fija, esto lo hará el constructor una sola vez para todas; si no lo es deberá usarse un ocular regulable. A pesar de que con un vidrio deslustrado, frecuentemente graduado con indicación del tiraje, siempre resulta preferible hacer esta regulación a la vez que se observa la imagen (fig. 6), dado que en este caso se integran todos los factores que deberán corregirse: longitud del tubo, tiraje de la cámara, grosor del cubreobjetos, índice y grosor del medio de montaje y longitud de onda de la fuente lumínica.

LA FOTOMACROGRAFÍA

Es por definición una fotomicrografía de pocos aumentos, siendo generalmente el aumento sobre la película de 2 a 50.

Aunque ello sea posible, no se recomienda utilizar el microscopio para tomar estas imágenes: efectivamente nos vemos obligados a escoger objetivos de muy pocos aumentos que generalmente tienen un campo de visión demasiado pequeño para lo que nos interesa. Siempre que se pueda, si el material lo permite, es preferible transportarlo bajo una instalación especializada formada por objetivos intercambiables especiales pero sin ocular. El objetivo está especialmente calculado para esta finalidad o bien se utiliza un objetivo invertido del aparato fotográfico de pequeño formato.

En fotomacrografía estamos frecuentemente obligados a registrar imágenes de objetos que tienen un cierto relieve y que se observan por reflexión. En este caso es mucho más difícil de realizar una iluminación correcta, dado que se requiere simultáneamente un cierto efecto unidireccional para traducir los relieves y una iluminación de fondo suficientemente uniforme para poner de manifiesto todos los detalles.

Cuando la iluminación es con luz transmitida se recomienda utilizar un condensador especial a gran campo y

situar un vidrio difusor en el trayecto de los rayos lumínicos. Si el vidrio deslustrado que tenemos posee un grano demasiado grueso que queda superpuesto a la imagen, se reducirá el tamaño del grano pasando un poco de aceite por su cara suave y eliminando el exceso de aceite con un papel de filtro hasta conseguir un grosor de grano deseado. Un filtro oleoso guarda largo tiempo sus propiedades. Sin embargo, a la larga, el aceite se evapora y progresivamente reaparece el grano.

En fotomacrografía se utilizarán frecuentemente emulsiones menos contrastadas que en fotomicrografía. Los filtros de contraste, los filtros que equilibran la temperatura de los colores, los filtros anticalóricos, serán los mismos. En el caso de tener que fotografiar imágenes de material inmerso en agua o montados en un medio transparente, pero iluminados por incidencia, bastará con eliminar los reflejos con la ayuda de un polarizador situado en el sistema de observación, antes del visor y ajustado el ojo hasta que desaparezcan los reflejos.

LA ILUMINACIÓN EN FOTOMICROGRAFÍA

Hay tantos tipos de iluminación como casos. En cada caso nos remitiremos al capítulo correspondiente.

La iluminación incidente de los objetos opacos. — Puede ser oblicua, central u omnilateral. En el primer caso la distancia frontal de objetivo debe ser suficiente para que podamos dirigir sobre el objeto el haz lumínico de la lámpara. En el segundo caso un iluminador especial dirige el haz a través del objetivo sobre la muestra. En el tercer caso un sistema anular rodea el objetivo. Cuando el haz incidente pasa a través del objetivo tenemos una imagen en fondo claro, cuando es oblicuo u omnilateral tenemos una imagen sobre fondo oscuro. Los iluminadores correspondientes han sido principalmente diseñados y puestos a punto para la observación de superficies metálicas. Aunque se han utilizado mucho en biología. La figura 36 presenta el esquema de la trayectoria de los rayos en los principales sistemas de iluminación incidente.

La iluminación en campo oscuro. — Necesita una potente fuente lumínica para que los tiempos de exposición sean aceptables. Los materiales deben ser poco numerosos en el campo de observación y nunca deben hallarse superpuestos. No deben haber burbujas de aire, ni en el medio de montaje, ni en el líquido de inmersión. A grandes aumentos el condensador debe tener su lente frontal pegada a la preparación mediante una gota de aceite de inmersión, del mismo tipo del que hay entre la preparación y el objetivo, ello representa algún que otro problema en el momento de desplazar la preparación. En las observaciones en campo oscuro el centrado del condensador y su enfoque sobre la preparación son muy críticos. Siempre es recomendable efectuar

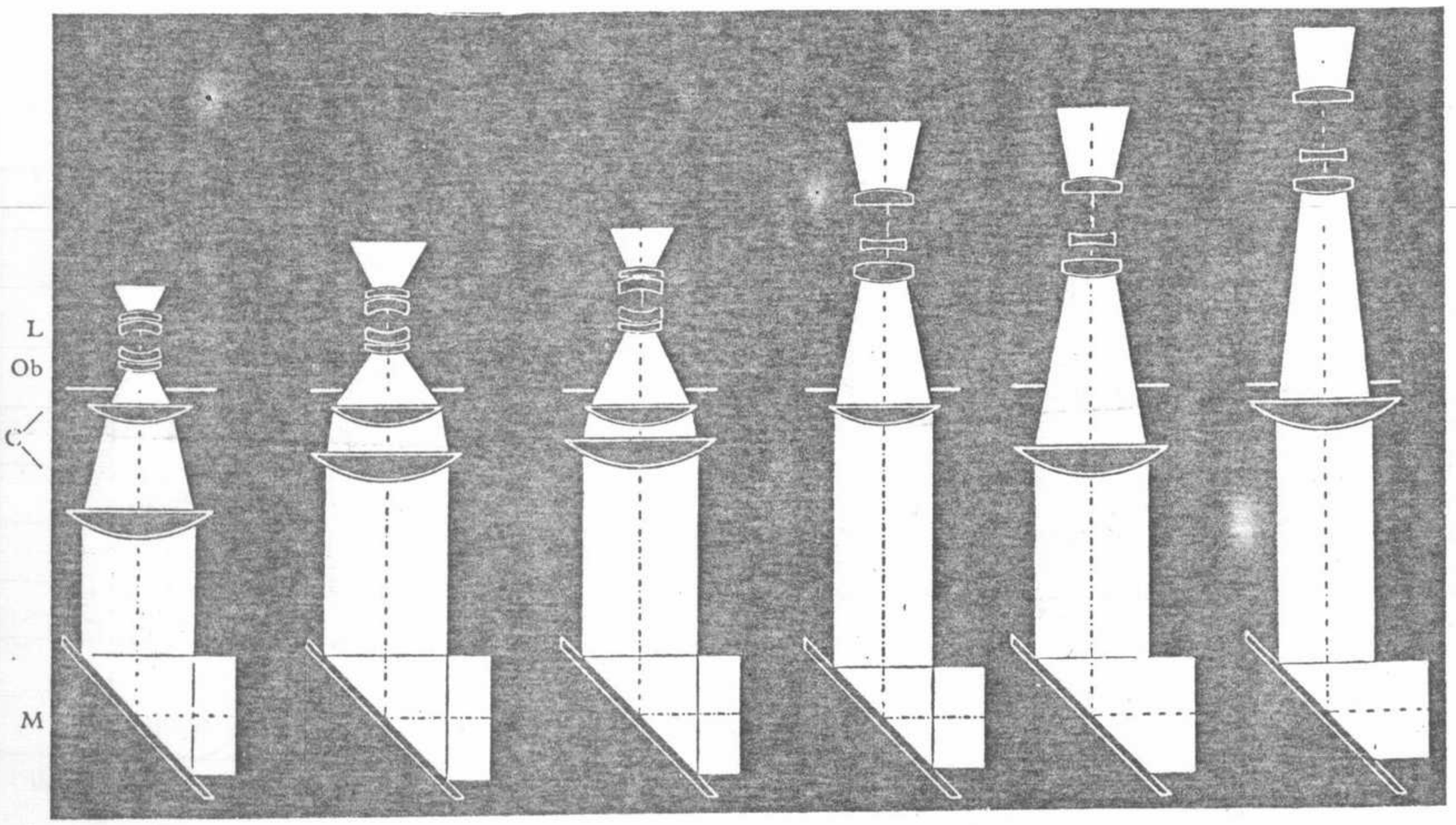


FIG. 59. — *Iluminación de un objeto transparente en fotomacrografía.* El condensador C, con una o dos lentes proyecta una imagen del manantial de luz sobre la pupila de entrada del objetivo L, a través del objetivo Ob. No hay diafragmas.

estos enfoques progresivamente, de pequeño a gran aumento.

La iluminación en campo claro. — Es la más frecuente. Desde el punto de vista fotográfico podemos hacer este mismo tipo de iluminación en los siguientes casos: los contrastes de fases positivos, las imágenes de polarización con compensadores; mientras que el contraste de fases negativo con una fuerte absorción, las imágenes entre nícoles cruzados sin compensadores y las imágenes de fluorescencia, cuando hay pocas estructuras fluorescentes, se asimilarán con las imágenes en fondo oscuro.

Antes de fotografiar una imagen microscópica debemos formularnos una serie de preguntas, puesto que raras veces un cliché fotográfico es superior al ojo del observador:

— ¿los contrastes del objeto son suficientes?
— ¿el poder de resolución es correcto?
— ¿el color dado por el sistema de iluminación es el óptimo?
— ¿la preparación es buena?
— ¿hemos escogido la emulsión fotográfica correcta?
— y, evidentemente, debemos saber si el fondo claro es la mejor elección que podemos hacer.

Para contestar la primera pregunta, la del contraste, debe examinarse con respecto a las restantes preguntas, dado que el contraste depende del poder de resolución, del contraste de los colores, de la preparación, del grosor del grano y del contraste de la emulsión. Si lo hemos puesto en primer término es porque representa la síntesis de los demás y tras una observación previa podemos juzgar una serie de parámetros y ver qué modificaciones podemos establecer para mejorar la calidad de la imagen.

Es imposible saber si el poder de resolución del objetivo es la causa de que la imagen se vea borrosa, si no hemos buscado sistemáticamente las causas de una mala imagen, tales como las expuestas en las páginas 32 y 33.

Para saber si el filtro coloreado es el adecuado debe consultarse el siguiente capítulo.

Si no hemos empezado el listado con la pregunta: ¿está bien la preparación?, es que el observador ante un material nuevo no tiene referencias precisas para poder juzgar si la preparación es o no representativa y buena. Al contrario, cuando se trata de trabajos de rutina sobre materiales estandarizados es evidente que ésta será la primera pregunta a formularse.

Para la elección de emulsiones, consúltese lo que sigue.

En todo lo que ha precedido hemos supuesto que la elección del fondo claro ha sido hecha con conocimiento de causa.

LOS FILTROS DE COLORES

Atendiendo a sus propiedades físicas existen tres categorías de filtros de colores que modifican la composición cromática de la fuente lumínica, normalmente de luz blanca, que los atraviesan.

LOS FILTROS DE PASO BAJO. — Son los que interceptan las grandes longitudes de onda y únicamente dejan pasar las de pequeña longitud de onda.

LOS FILTROS DE PASO ALTO. — Son los filtros que absorben las radiaciones de corta longitud de onda y únicamente dejan pasar las de larga longitud de onda.

LOS FILTROS PASO-BANDA. — Son filtros que dejan pasar una o varias bandas del espectro utilizado (fig. 60).

La asociación de un filtro de paso bajo y de un filtro de paso alto permite la obtención, por superposición, de un filtro de paso-banda si el dominio transmitido por uno invade el dominio transmitido por el otro.

Un filtro anticalórico es un filtro paso-banda para todo el espectro visible.

Los filtros paso-banda son: de gelatina (filtros Wratten-Kodak), de vidrio, interferenciales, mixtos, líquidos, polarizadores. Los filtros interferenciales tienen una ventaja sobre los otros, la de tener una banda fluctuante con los pies abruptos y que permite un cierto desplazamiento de la banda pasante por rotación sobre un eje perpendicular al haz. Son más absorbentes que los otros.

Aconsejamos al microscopista que tiene que

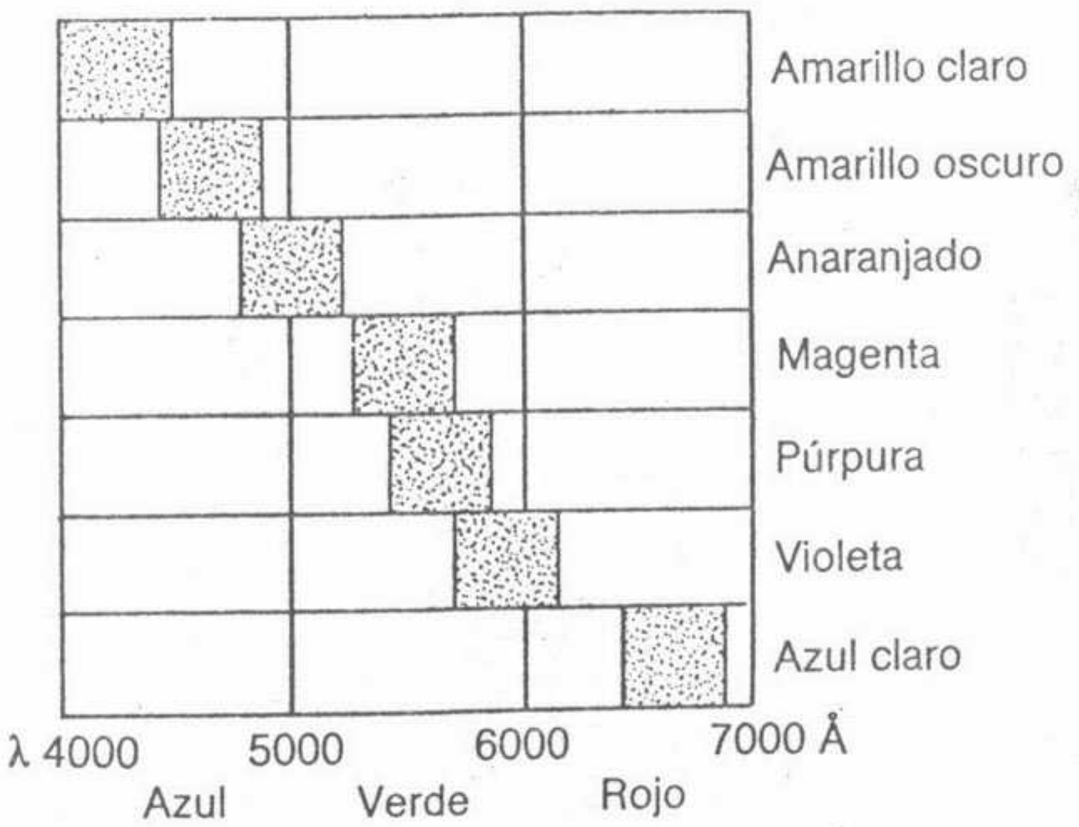


FIG. 60. — *Posición de las bandas de absorción y colores transmitidos por filtros.*

observar materiales teñidos con distintas técnicas disponer de un surtido de filtros, como el que a continuación especificamos:

Filtro anticalórico, preferentemente interferencial, «espejo frío» interferencial.

Filtros compensadores de colores, serie de 36 filtros de gelatina Kodak-Wratten. Es esta serie completa, de filtros de la Cromotaxia de Locquin, montados sobre lengüetas dispuestas en abanico, que permiten al operador que no tenga nociones colorimétricas especiales una búsqueda rápida del mejor filtro de contraste (cf. p. 65).

Filtros monocromáticos, preferentemente interferenciales, para seleccionar una banda en el espectro de una lámpara de descarga, o para disponer de una banda ancha con una lámpara de espectro continuo. Consultar la tabla para su elección en función de las bandas que deben seleccionarse.

Filtros de paso alto y de paso bajo complementarios, para la fluorescencia el filtro de paso bajo sirve de filtro de excitación; el filtro de paso alto, de filtro de observación (cf. pp. 52 y 53).

Filtros policromáticos para incrementar los contrastes de colores. Este filtro es uno de los más usados para la observación rutinaria y para la fotografía.

Generalmente escogemos los filtros de contraste más útiles atendiendo a lo que se quiera obtener, bien sea la mejor definición de la imagen en un determinado color o bien si se quiere obtener el mejor contraste con relación a los colores de otros detalles del objeto. Estas dos finalidades generalmente son incompatibles, sobre todo en el caso de trabajar en blanco y negro.

La foto monocromática. — Cuando la finalidad de la fotografía es la obtención de un cliché reproduciendo con la máxima fidelidad los detalles más finos de una imagen incolora o monocromática es aconsejable utilizar un filtro monocromático de la más corta longitud de onda posible, que sea compatible con la corrección del objetivo y con el color del material.

La foto policrómica en colores. — Si la muestra es policrómica y debe fotografiarse en color, debemos saber que la cualidad que ofrecen las emulsiones de color pueden dar un resultado decepcionante si la banda transmitida por el color de la muestra se encuentra, por ejemplo, en los límites entre dos de las tres primarias de la emulsión. En este caso, por desgracia muy frecuente, se recomienda emplear filtros de neodimio líquidos o en vidrio con didimio (neodimio + praseodimio). Estos filtros tienen bandas múltiples de absorción, favorablemente situadas en el límite de los grandes dominios de sensibilidad del ojo a los colores. Intensifican la pureza de éstos y, así, hasta cierto punto, compensan la degradación de la pureza producida por las emulsiones de color. La tabla II da la fórmula de un filtro líquido de neodimio.

FILTROS CORRECTORES DE COLOR KODAK-WRATTEN DE LA CROMOTAXIA

Densidad máxima	*Amarillo (Y) (absorbe el azul)*	*Coef.*	*Magenta (M) (absorbe el verde)*	*Coef.*	*Cian (C) (absorbe el rojo)*	*Coef.*
05	CC-05 Y		CC-05 M	1,3	CC-05 C	1,3
10	CC-10 Y	1,3	CC-10 M	1,3	CC-10 C	1,3
20	CC-20 Y	1,3	CC-20 M	1,3	CC-20 C	1,3
30	CC-30 Y	1,3	CC-30 M	1,6	CC-30 C	1,6
40	CC-40 Y	1,3	CC-40 M	1,6	CC-40 C	1,6
50	CC-50 Y	1,6	CC-50 M	1,6	CC-50 C	2

Densidad máxima	*Rojo (R) (absorbe el azul y el verde)*	*Coef.*	*Verde (G) (absorbe el azul y el rojo)*	*Coef.*	*Azul (B) (absorbe el rojo y el verde)*	*Coef.*
05	CC-05 R	1,3	CC-05 G	1,3	CC-05 B	1,3
10	CC-10 R	1,3	CC-10 G	1,3	CC-10 B	1,3
20	CC-20 R	1,3	CC-20 G	1,3	CC-20 B	1,6
30	CC-30 R	1,6	CC-30 G	1,6	CC-30 B	1,6
40	CC-40 R	1,6	CC-40 G	1,6	CC-40 B	2
50	CC-50 R	2	CC-50 G	2	CC-50 B	2,3

La gama de los colores y de las densidades de estos diferentes filtros permite aportar las correcciones útiles en casi todos los casos posibles.

También pueden utilizarse los filtros policromáticos interferenciales, que tienen como ventaja, respecto a los de didimio, poder hacer variar la posición de las bandas de absorción, al inclinar el filtro sobre el haz. Los filtros policromáticos interferenciales de 3 a 5 bandas son los más útiles. Tienen, sin embargo, un inconveniente: la posición y la distribución de las bandas es menos buena que la de los filtros de didimio.

Las iluminaciones diferenciales coloreadas de Rheinberg pueden también emplearse siguiendo tres variantes:

— Filtros de color recortados en dos o tres sectores, teñidos de distinto color y situados en el portafiltros del condensador. Se obtiene un cierto efecto azimutal haciendo girar el conjunto.

— Filtros concéntricos dispuestos en un condensador de campo claro, es deseable en este caso que el filtro de la longitud de onda más corta esté situado en la periferia.

— Filtros dispuestos en condensadores mixtos de fondo claro y fondo negro, el filtro de fondo negro tiene la longitud de onda más corta. Es ésta la solución que da resultados óptimos, las imágenes más detalladas y más contrastadas. Pero es indispensable hacer inmersión del condensador a aumentos elevados.

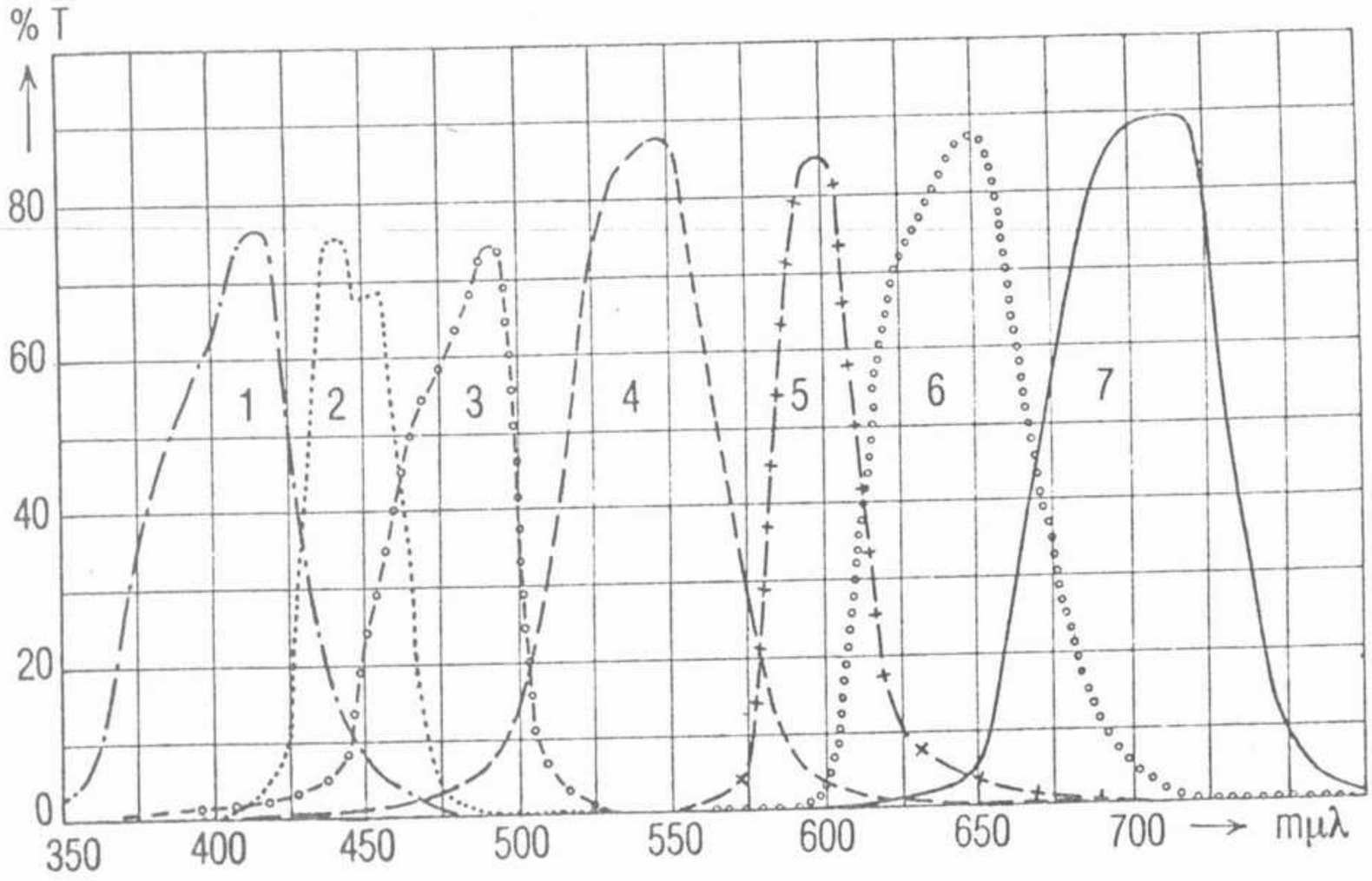
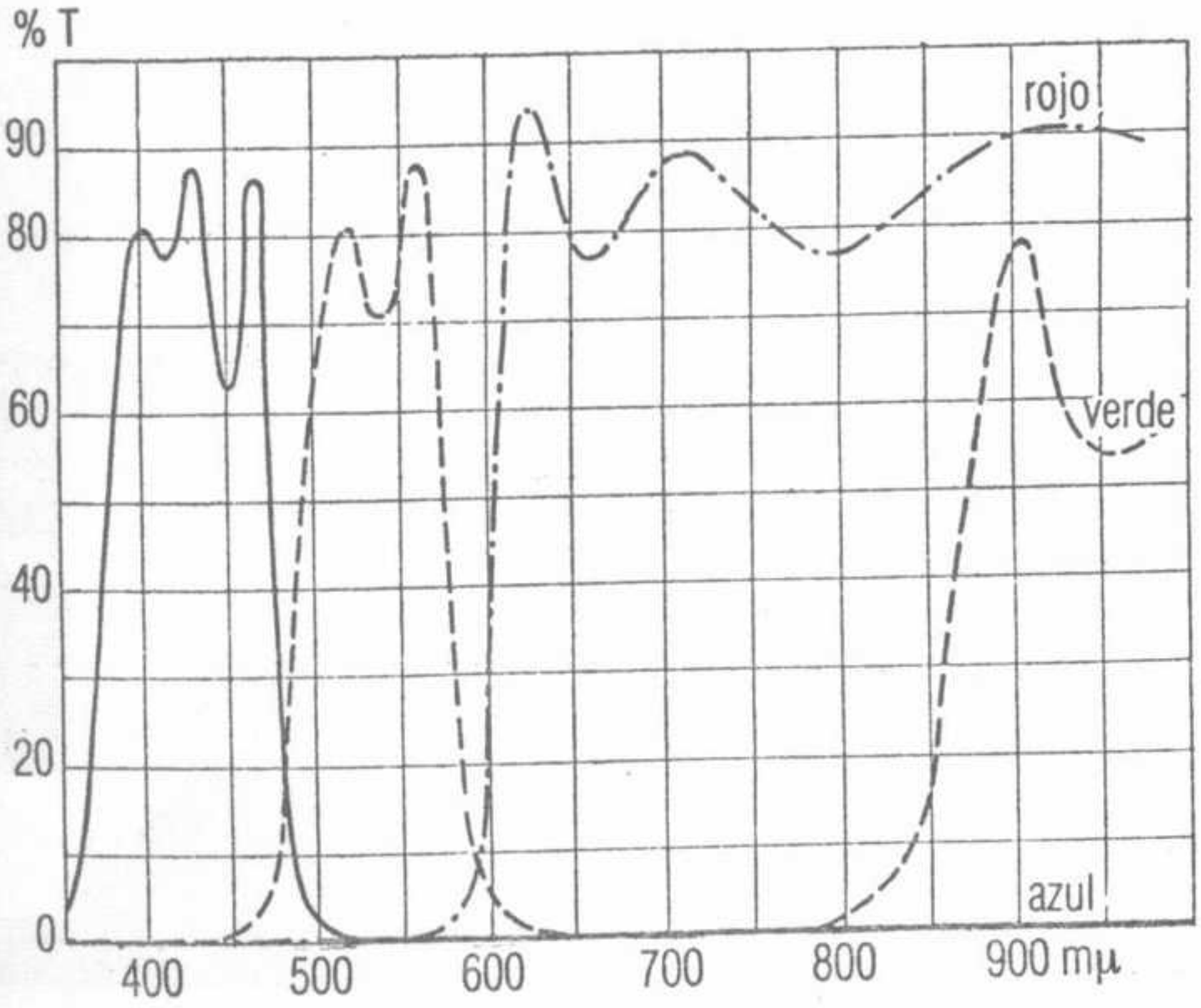


FIG. 61. — *Serie de 7 filtros K de Balzers.* Documento Balzers Liechtenstein.



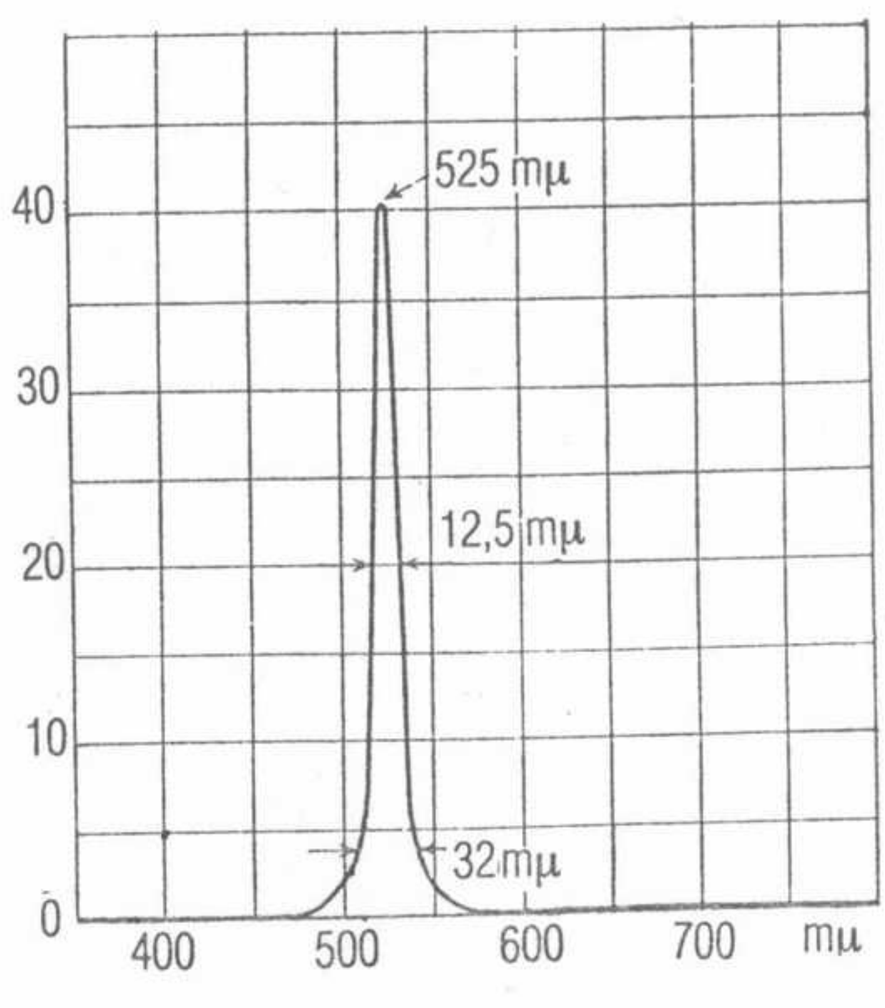


FIG. 62. — *A la izquierda, serie de 3 filtros DT; a la derecha, filtro interferencial monocromático Filtraflex.* Documento Balzers Liechtenstein.

DIFERENCIAS CROMÁTICAS DE LA EMISIÓN Y DE LA RECEPCIÓN

Generalmente intervienen tres factores en microscopia, tanto si se trata de hacer una observación rutinaria como cuando se trata de obtener imágenes, para falsear el resultado cromático correcto final de las manipulaciones: el equilibrio cromático del sistema de iluminación, la sensibilidad del ojo, variable en función de la iluminación y la sensibilidad cromática de la emulsión fotográfica.

Ahora no hablaremos del cromatismo de la muestra ni de los filtros de color, ya que estos aspectos han sido tratados en el capítulo anterior.

Si la fuente lumínica utilizada es un espectro continuo, sin bandas superpuestas, podemos definir un parámetro físico denominado «temperatura de color» que de alguna forma expresa una desviación con respecto al blanco perfecto, desvío hacia el amarillo y después hacia el naranja si la temperatura baja de los 5500 K, desviación hacia el azul si sobrepasa este valor. Este valor de referencia ha sido escogido porque es el de un cielo blanco luminoso a 25° por debajo del horizonte al mediodía, en febrero y en noviembre, y a las 7 h o a las 17 h, hora solar, en junio-julio sobre nuestras latitudes.

En los filamentos de las lámparas eléctricas calentadas por efecto Joule, la temperatura de color varía según la marca con la atmósfera contenida en la lámpara: argón, criptón y después el xenón; cada uno de ellos eleva algo más la temperatura de color, dado que permiten una mayor elevación de temperatura del filamento, sin la evaporación rápida de éste, produciendo un ennegrecimiento de la lámpara, con una pérdida de transparencia y de luminosidad y de la temperatura de color. Se ha conseguido un considerable progreso con las lámparas de yodo-cuarzo y después con las de halógeno. En éstas la adición de yodo o de una mezcla de bromo-yodo en la atmósfera de criptón o de xenón de la lámpara permite simultáneamente: una considerable reducción del volumen de éste y una temperatura más elevada, dado que las moléculas de tungsteno del filamento, evaporadas por calentamiento, se combinan con los halógenos a alta temperatura y vuelven a caer sobre el propio filamento, disociándose, lo cual conduce a su degeneración. El cuarzo utilizado para la construcción de la lámpara se somete al rojo claro durante el funcionamiento, resiste los choques térmicos y permanece impermeable al gas a elevada temperatura.

El ojo es sensible a una variación de 50 K hacia 3200 K, únicamente detecta variaciones del orden de los 200 K a los 5900 K. Cada emulsión de color está concebida para una temperatura de color óptima, precisada por la casa fabricante. Los vidrios utilizados para la fabricación de la óptica del microscopio, desde el colector de la lámpara hasta el ocular, pasando por el condensador, el objetivo, los prismas, las capas separadoras, etc., introducen también una cierta variación de la temperatura de color de la fuente lumínica, lo que determina que las consideraciones teóricas más bien elaboradas no impedirán que el microscopista preocupado en obtener imágenes en color de alta calidad, pueda hacer él mismo un tanteo previo, elaborar su escala de temperaturas de color para hallar las condiciones de trabajo óptimas con la ayuda de filtros compensadores de color.

Cuando la fuente lumínica no es continua, pero tiene un espectro de bandas o es mixto, con un espectro de bandas superpuesto con fondo continuo resulta imposible utilizar la noción de la temperatura de color. De forma general podemos asegurar que lámparas de este tipo no deben ser utilizadas para obtener imágenes fotográficas en color, salvo en ocasiones especiales, que serán en cada caso mencionadas.

Si no se procede a hacer las correcciones con los filtros de color, la imagen registrada será muy diferente de la imagen observada.

MANERA DE PROCEDER PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES EN BLANCO Y NEGRO

Se desea obtener una buena imagen de conjunto con toda una gama de grises que nos ofrezca el detalle de las tonalidades coloreadas del objeto, o bien hacer resaltar un conjunto de detalles significativos y hacerlos destacar mediante un gris oscuro o con un negro intenso. En cada uno de estos casos la elección de un buen filtro compensador de colores permite obtener un buen resultado. En líneas generales deberá procederse de la siguiente manera:

1.° Identificar uno o dos colores fundamentales con o sin fondo coloreado. Sea por ejemplo un objeto con detalles rojos y azules sobre fondo verde. Para traducir los rojos en gris oscuro se hará con una emulsión pancromática sensible al rojo, trabajar con filtro compensador de colores que absorba el rojo presente en la luz blanca de la fuente de iluminación; pero para que los azules aparezcan con una tonalidad gris mediana y el conjunto sobre un fondo blanco, conviene absorberlos ligeramente a fin de aumentar el contraste con relación al verde. Esto puede parecer excesivamente teórico a los que no conocen el tema con profundidad; nosotros preferimos utilizar el segundo sistema.

2.° Disponer de los 36 filtros de la serie Wratten «compensadores de color» de Kodak. Resulta muy cómodo utilizar esta serie tal como se encuentra, completa y montada sobre lengüetas que

pueden desplegarse en forma de abanico en la *Chromotaxia* de M. Locquin, París, ed. del autor, 1956. Desplegar los abanicos de tal manera que los filtros estén uno al lado del otro y ponerlos sucesivamente en la trayectoria del haz luminoso, atentamente el ojo apreciará las modificaciones de contraste que ofrecen. Cuando se hayan detectado los dos mejores filtros de color para nuestro material, y de densidad, se superpondrán para saber si son compatibles, es decir, que no sean complementarios, lo que determinaría nuevamente la aparición del gris. En este caso concreto debería procederse, por aproximaciones sucesivas, a un ligero deslizamiento cromático de uno de los filtros, sustituyendo por ejemplo un filtro rojo R. 40 por uno anaranjado obtenido por la superposición de Y. 20 amarillo y de R. 20 rojo, lo cual origina un anaranjado 40.

Deberemos recordar que en ocasiones es preferible volver a teñir una preparación defectuosa que intentar hacer una buena fotografía.

La tabla de la página 62 da el factor aumento de tiempos de exposición de los 36 filtros Wratten de la *Chromotaxia* en las columnas indicadas por «coeff.».

MANERA DE PROCEDER PARA LA OBTENCIÓN DE IMÁGENES EN COLOR

Es imprescindible ajustar la temperatura de color de la luz que ha atravesado el microscopio con la de la emulsión fotográfica. Para ello se debe tener un sistema de iluminación fijo y de intensidad estabilizada para una determinada temperatura de color; esto requiere una alimentación constante del filamento o un miliamperímetro suficientemente preciso para encontrar las mismas constantes a lo largo de las operaciones sucesivas. Para regular la intensidad lumínica, y por consiguiente el tiempo de exposición, debe disponerse únicamente, bien sea de difusores para los objetivos débiles, o bien filtros Wratten de la serie neutra ND de Kodak. Tras haber efectuado una serie de diapositivas o de copias de papel, sin filtros, interceptando las radiaciones lumínicas que penetran en el microscopio, se observarán delante de una fuente lumínica blanca intensa, pero no fluorescente —es muy importante prohibir los tubos que emiten un espectro de bandas superpuestas al espectro continuo de su alrededor—; se buscará cuál es el filtro compensador de colores que restablezca un fondo blanco en las partes donde no hay la muestra.

También pueden confeccionarse preparaciones test recortando cuatro pequeños cuadrados de filtros de gelatina Wratten compensadores de colores montándolos entre porta y cubreobjetos, como si se tratara de una muestra y se fotografiarán con un objetivo de pocos aumentos, superpuestos a la muestra, pero este sistema es más largo y menos general, ya que excluye las superposiciones de filtros, fáciles de obtener con diapositivas.

COMPENSACIÓN EQUILIBRADA DE COLORES

Para obtener un resultado correcto de los colores sobre una emulsión fotográfica de color debe conseguirse un buen equilibrio: temperatura de color de la fuente lumínica tras haber cruzado todo el sistema óptico del microscopio y temperatura de color para la cual ha sido fabricada la película.

Hay cuatro métodos generales para ello. Trabajando con filtros únicamente actuamos sobre el equilibrio azul-amarillo o sobre el verde-magenta, dado que el centro amarillo-verde del espectro se toma como referencia.

1.° **Compensación: Azul-U.V. en exceso.** — Si el cliché ha sido impresionado con un exceso de longitudes de onda corta, aparece una dominante azul. En este caso se corrige buscando un filtro amarillo que, sobre la diapositiva, haga desaparecer este azul, a continuación se somete a la iluminación del microscopio para hacer la fotografía. Los filtros Y de la serie CC Wratten-Kodak, que encontramos en la Chromotaxia de Locquin, son perfectamente viables. Un excelente filtro líquido puede ser una solución de nitrito sódico a la que iremos añadiendo agua hasta conseguir la compensación deseada. Se parte de una solución madre del 10 %.

2.° **Compensación: Azul en defecto.** — Si falta azul en las imágenes tomadas, aparece una dominante amarilla, más o menos dorada. Se corrige mediante un filtro azul o ciano. Este último es el más frecuentemente utilizado. Forman igualmente parte de la misma serie Wratten; son los filtros B y C. Si se desea obtener un filtro líquido azul, puede recurrirse al sulfato de cobre amoniacal; es excelente.

COMPENSACIÓN COMPLEMENTARIA VERDE-MAGENTA. — Una vez efectuadas correctamente las dos compensaciones indicadas, puede aparecer un desequilibrio residual verde-magenta, que se corregirá con un filtro magenta para eliminar la dominante verde, o la inversa, aunque este último caso se hace raras veces. Un filtro líquido tipo neodimio es muy conveniente.

3.° **Compensación por alimentación de la fuente lumínica.** — No debe utilizarse más que para compensaciones débiles o para completar una compensación efectuada por uno de los dos mé-

todos. Generalmente los ópticos actuales introducen una dominante verde que se corrige con un filtro magenta o con un filtro de didimio.

4.° **Evaluación por los decamireds.** — A fin de poder evaluar correctamente el filtro utilizado en la compensación se transforman las temperaturas de color de la fuente lumínica en decamireds:

$$1 \text{ decamired} = \frac{100{,}000}{K}$$

seguidamente se calcula el decamired del filtro que se usará, aplicando la fórmula:

Deca film - Deca sistema iluminación = Deca filtro

Una fuente lumínica de 30 W/5 A funcionando a 2900 K tiene 34,5 decamireds. Una película de color inversible tiene por ejemplo 31,2 decamireds. Para la corrección se interpondrá un filtro de –3,2 decamireds. En el G. Betton de 1969, páginas 107 y 108 se encontrará una tabla de decamireds de los principales sistemas de iluminación, así como de las emulsiones fotográficas. Esperemos que los fabricantes indiquen regularmente los decamireds sobre las cajas que contienen sus emulsiones de color.

VARIACIONES Y DEFECTOS DE LAS EMULSIONES DE COLOR

Las emulsiones fotográficas de color generalmente están formadas por tres capas «en sandwich» depositadas sobre el soporte plástico y protegidas por intermediarios. Si cuando se fabrican, el grosor de alguna de estas capas varía, aunque sea poco, habrá un desequilibrio de los colores que no superará los límites que puede corregir un filtro compensador de colores de densidad 0,10. Cuando se consume una considerable cantidad de película de color tendremos interés en comprar un lote que lleve el mismo número de fabricación de serie. Al cambiar el número se deberá volver a establecer el equilibrio de colores.

Es muy importante recordar que los tiempos de exposición tienen una influencia sobre el equilibrio de colores. Las emulsiones corrientes están fabricadas para dar un equilibrio entre 1/50 a 1/100 de segundo. Si los tiempos de exposición son mucho más largos, lo cual es frecuente en fotomicrografía, el hecho de que la sensibilidad de una emulsión decrezca con las débiles iluminaciones y que los grosores de las tres capas no sean idénticos provoca un desequilibrio de colores.

Una conservación demasiado larga en condiciones de humedad o de temperatura excesiva provoca un desequilibrio del balance de colores. Por lo que deberemos seguir las recomendaciones del fabricante.

Es aconsejable no almacenar las películas en lugares donde se guardan reactivos químicos volátiles, como: formaldehído, ácido nítrico, y en general cualquier compuesto volátil. Pueden formarse velos, desequilibrios de colores o modificaciones de la sensibilidad.

Los velos que apreciamos pueden también ser originados por una exposición intempestiva a la luz o a veces por radiaciones tales como los rayos X, actualmente utilizados en los servicios de aduanas para detectar objetos metálicos en los embarques de los aviones.

El microscopio o el aparato de proyección, como consecuencia de la temperatura de colores de su filamento, puede provocar un desplazamiento más o menos acentuado hacia el amarillo. Por ello se tomará la precaución de no examinar jamás un equilibrio de colores a la luz de tubos fluorescentes: la raya verde del mercurio está frecuentemente presente, dado que atraviesa fácilmente la pared del tubo y provoca un exceso de verde en la imagen.

LAS EMULSIONES

La elección debe hacerse atendiendo el resultado pretendido, que no siempre depende del propio cliché o de su positivado, pero sí depende frecuentemente del resultado que da al ser impreso en una publicación. Deben tenerse siempre presentes todos los elementos de una cadena, dado que su rendimiento final depende a la vez del más pequeño de los detalles y del efecto sumatorio de defectos y errores, dado que es muy difícil que dos defectos lleguen a compensarse.

Los factores que definen una emulsión son los siguientes:

Dominio espectral de la sensibilidad.
Contraste o γ.
Poder de resolución del grano.
Rapidez o sensibilidad.
Latitud del tiempo de exposición.

Estos factores son interdependientes y los fabricantes no pueden suministrar emulsiones que tengan a la vez un elevado grado de resolución y una gran rapidez, o un fuerte contraste y un margen espectral extenso.

Las muestras al microscopio generalmente tienen un contraste más débil que los objetos que nos rodean, por ello debemos escoger emulsiones que tengan un fuerte contraste. Es interesantísimo y muy deseable que dicho contraste vaya acompañado de un potente poder de resolución y de una gran pequeñez de tamaño de grano, pero por el contrario la rapidez es escasa y el tiempo de exposición bastante elevado.

EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN

La explotación correcta de las posibilidades de la emulsión depende ante todo de su elección, aparte de la muestra y de los cinco factores antes citados, y de una exposición correcta. Para obtener el máximo de sus posibilidades debe tenerse muy en cuenta el tiempo de exposición.

Los equipos modernos tienen casi todos fotosensores suficientemente sensibles como para efectuar mediciones en todas las condiciones de trabajo. Deben tenerse presentes también los datos sensitométricos de la emulsión, habitualmente indicados en ASA o en DIN y verificar, haciendo una selección previa, que los márgenes dados por el fabricante sean correctos. Si no se han establecido márgenes que se obtendrán para cada aumento probando una serie de tiempos de exposición en una progresión de $\sqrt{2}$.

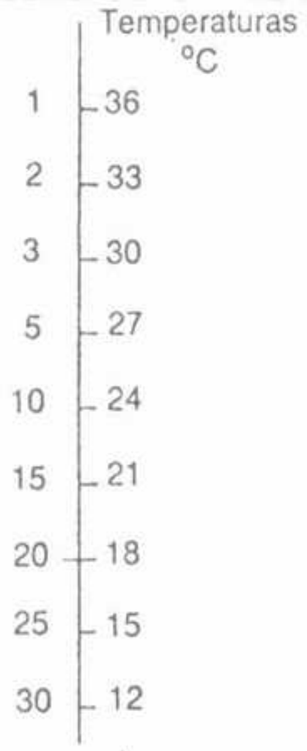


FIG. 63. — *Correcciones medias con respecto a los tiempos relacionados con reacciones químicas tales como: fijación, tinción, revelado de las emulsiones fotográficas.* A la izquierda, el factor multiplicador en función de la temperatura, a la derecha.

ÁREA DE MEDIDA DEL TIEMPO DE EXPOSICIÓN

Sea cual fuere el sistema utilizado para medir la cantidad de luz que impresionará la película, la cara sensible de la emulsión, todo operador, ante la gran diversidad de materiales y la gran variedad de métodos de observación, un día se plantea la cuestión: ¿debo efectuar una medición global, local o puntual, sobre el fondo o sobre el objeto? Intentemos encontrar un método lógico de elección, ya que el problema no es sencillo y además las cámaras fotográficas no todas permiten probar estas variantes.

Medición por integración global. — Estando el objeto en el campo, integra, es decir, obtiene la suma y la media de toda la luz procedente del campo observado. En fondo claro, y si el objeto no es particularmente opaco, da buenos resultados si el escalado ha sido bien hecho, dado que pocos objetos, aunque cubran todo el campo de observación, absorben más del 20 % de la luz incidente. Por el contrario, este método debe desaconsejarse en el caso del fondo oscuro, de la fluorescencia, así como cuando se trabaja con luz polarizada, cuando el fondo es negro o gris oscuro. Efectivamente, la integración de este hecho es más bien proporcional al número de muestras en el campo de observación o a su superficie, dado que el fondo no interviene. En contraste de fases o en contraste interferencial, así como en polarización, con una tonalidad sensible o cuarto de onda, el método es perfecto, salvo en el caso particular de los contrastes negativos con una fuerte absorción que se aproxima al fondo oscuro.

Medición local. — Limita la zona de medición a un círculo o a un cuadrado que tiene alrededor de una décima parte del diámetro del campo, puede circunscribirse la medida a un objeto, o a un detalle del objeto, mientras que éste sea conducido por los movimientos de la platina al centro del campo donde se encuentra generalmente la placa de medición. Se trata en realidad del método anteriormente descrito, con sus mismas limitaciones, pero aplicable por ejemplo a un objeto concreto rodeado por otros que no interesan y con densidades muy distintas.

Medición puntual. — Es la más larga, la que también necesita el equipamiento más costoso, pero es la única que permite hacer simultáneamente las mediciones de la luminosidad y de los contrastes del material. En realidad, el instrumento actúa como si fuera un microfotómetro (cf. pág. 90).

En la práctica nos limitaremos pues a las mediciones globales por integración, introduciendo un factor corrector en función de objetos determinados por el uso o estadísticamente predeterminados por el constructor y seleccionados.

REVELADO

El contraste, el grano, la sensibilidad de una emulsión están muy influenciados por las condiciones en que se lleva a cabo el revelado: elección del revelador, tiempo y temperatura. En todos los casos es aconsejable estandarizar estas variables. Los fabricantes de emulsiones generalmente entregan junto a los reveladores las instrucciones de manejo detalladas y relacionándolas con las emulsiones con las que pueden trabajar para obtener una determinada γ.

De forma general, recordaremos que un alar-

gamiento en el tiempo del revelado, así como una alcalinización del baño, aumentan el contraste.

Al acabar el revelado siempre deberá sumergirse la emulsión en un baño de paro que contenga un 7 % de ácido acético.

La fijación durará un tiempo prudencial, ya indicado, necesario para hacer desaparecer todas las trazas visibles del bromuro de la emulsión. Cuando el baño está recién preparado este proceso es sumamente rápido, el tiempo aumenta a medida que usamos el baño. Cuando este tiempo se cuatriplica deberá tirarse el baño y preparar otro nuevo.

Si se quieren conservar largo tiempo los negativos conviene que el lavado sea largo.

Los clichés Polaroid que también quieren conservarse largo tiempo, tanto como las copias de papel, deberán lavarse cuidadosamente antes de poner el barniz.

Antes de secar es aconsejable colocar en el último lavado un agente humectador que evite que queden retenidas trazas calcáreas del agua cuando ésta se evapora durante el secado. El secado deberá efectuarse resguardando los negativos del polvo.

POSITIVADO

Los laboratorios de microscopia que deseen obtener positivos sobre papel de excelente calidad hacen ellos mismos el positivado. Conocedores del material que han fotografiado, son los únicos que pueden sacar el máximo partido de sus negativos.

Se utilizarán siempre papeles blancos brillantes o mates. Los papeles mates permiten hacer retoques puntuales con lápiz. Los papeles brillantes son más contrastados. Los papeles de grano calandrado deben desecharse salvo para las exposiciones. Los soportes plásticos no son adecuados para microfotografía.

ARCHIVO

La mejor foto es desechable si a partir de ella no podemos encontrar el negativo de la cual ha sido extraída, encontrar la preparación, es decir, llegar a su origen.

Para ello, debe adoptarse un sistema uniforme de clasificación a partir de un número atribuido al negativo. Este número debe figurar en todas las copias, en todas las diapositivas y deberá existir un cuaderno de registro cronológico que nos dé automáticamente el número de la preparación y de los materiales, con indicaciones de su origen, el método de preparación, tinción, montaje, fecha y operador.

TRANSPOSICIÓN DE CONTRASTES

A nivel de emulsión fotográfica podemos obtener diversas transposiciones de contraste. Históricamente es a M. Locquin (1950) a quien se atribuye la primera transposición de un contraste negro y blanco en un contraste de color en microscopia, por un procedimiento eminentemente fotográfico.

Actualmente, este procedimiento, excesivamente largo, ha sido sustituido por otros electrónicos, la mayor parte del tiempo aplicados a clichés radiográficos, pero que siempre pueden aplicarse a los clichés micrográficos.

También puede partirse de una imagen en colores y registrarla en emulsiones de colores especiales, sensibles en las proximidades del infrarrojo o próximas al ultravioleta, y transponiendo ellas mismas estas bandas en un color visible. También se puede disponer, en todo caso, de una cámara de televisión de color de tomas secuenciales, hacer la transposición interviniendo dos o tres de los canales. Estas transposiciones coloreadas no son un juego. Responden a una necesidad de lectura de la imagen. Efectivamente, los objetos observados con mayor frecuencia al microscopio, son coloreados artificialmente por el operador.

Algunas sustancias histoquímicas únicamente tienen afinidad hacia unos colorantes muy concretos y éstos no siempre tienen una banda de transmisión que corresponda al máximo del poder discriminador del ojo. Una buena transposición restablece las mejores condiciones de lectura de la preparación.

Los filtros interferenciales dicromáticos o policromáticos a 3, 4 o 5 bandas, tienen la propiedad de permitir el desplazamiento de las bandas con el ángulo de incidencia de la luz. Colocados sobre una montura rotativa con eje perpendicular al haz, provocan con poco gasto transposiciones y deslizamiento de contraste muy útiles, en ocasiones, espectaculares.

EFECTOS ESPECIALES EN FOTOMICROGRAFÍA

Efectos de la impresión de la imagen. — **Iluminaciones policromáticas de Rheinberg.** — Colocando debajo del condensador un disco formado por dos filtros de colores concéntricos y observando objetos refringentes, como fibras o diatomeas, se obtienen unos efectos de coloración puramente ópticos, fáciles de registrar sobre las emulsiones de color. Una interesante variante consiste en combinar los dos colores con dos métodos distintos de observación: fondo negro y fondo claro por ejemplo o fondo claro y contraste de fases negativo.

Efectos del revelado. — **Solarización** del negativo original o lo que es más seguro un tiraje negativo de un positivo intermediario; de esta manera no se tiene el riesgo de destruir un original si el resultado no es satisfactorio. Revelar 1/3 del tiempo normal, exponer a la luz de una lámpara de 40 W a 1 metro de distancia durante 5 segundos o más, continuar el revelado durante los otros 2 tercios del tiempo total. Fijar, lavar. Sacar un positivo con papel duro. El resultado es efecto del «liserado» de los contornos de igual densidad que el objeto, que parece un dibujo hecho a trazos.

Virajes. — Siempre se debe trabajar sobre positivos menos contrastados que para las observaciones directas, dado que todos los virajes comportan un incremento del contraste. Los tonos sepia se obtienen pasando los positivos por un baño de monosulfuro de Na al 15 % tras lo cual se blanquea con un baño de ferricianuro de K: 10 g + bromuro de K: 10 a 25 g + agua hasta 100 ml. Una fuerte concentración de bromuro aumenta la tonalidad. Los tonos azules se consiguen mezclando extemporáneamente la dos soluciones: **A**: ferricianuro de K: 0,2 g + ácido sulfúrico: 0,4 ml + agua: 100 ml y **B**: citrato de hierro amoniacal: 0,2 g + ácido sulfúrico: 0,4 ml + agua: 100 ml. Se tratan los papeles, tras fijación y lavado cuidadoso. Tras el viraje se lava. Un lavado prolongado puede debilitar la tinción.

Transposición de densidades en contraste de colores. — La lectura de imágenes de materiales en blanco y negro portadoras de una considerable gama de contrastes es facilitada por una transposición en colores siguiendo la técnica de Locquin (1950). Las operaciones son largas y complicadas pero el resultado es sorprendente.

Efectos del tiraje. — **Tirajes duros.** — Bien sea a partir de un negativo o bien a partir de un positivo sobre película. Siempre que el objeto se preste a ello, pueden obtenerse clichés que pueden ser reproducidos directamente sin trama previa, lo cual representa un considerable ahorro en el coste de la publicación, pero el negativo debe estar muy contrastado y que no hayan medias tintas.

Paraglifos. — Obtenido por superposición ligeramente desplazada de un negativo y de un positivo del mismo cliché y tirar una nueva prueba de este negativo compuesto. Los resultados obtenidos se parecen enormemente a las imágenes formadas con el contraste interferencial. Hay un efecto de sombra oblicua que hace aparecer el objeto en relieve. La réplica negativo-positivo es facilitada si se trazan fuera del cliché dos cruces de referencia, diagonalmente dibujadas.

Isohelia. — Es hasta cierto punto una separación de tonos que permite resaltar algunas densificaciones de la imagen y minimizar otras. Se parte de un positivo intermediario, tirando una serie de negativos sobre una emulsión muy dura, con tiempos de exposición muy largos y crecientes, en total de diez. Se escogen los tres que representan mejor las bandas de densidad que nos interesa reproducir y se copian repetidas veces sobre el mismo positivo pero en papel suave. Es un procedimiento análogo a la transposición de contrastes, pero sin color.

Superposiciones. — Para efectuar contajes o réplicas es en ocasiones muy útil superponer a la imagen del objeto, en el momento de la impresión, un cuadriculado o flechas de referencia. Si se superpone un cuadriculado positivo al papel se obtiene la imagen negativa de dicha cuadrícula. Para tener una imagen positiva hay que proceder en dos tiempos con una red negativa, la segunda exposición se ha efectuado tras haber quitado el negativo de la ampliadora.

Complementariedad. — Si se sobreponen un negativo y un positivo de la misma imagen se obtiene un gris casi uniforme. Esta técnica fue utilizada por Locquin para realizar los aparatos automáticos de reconocimiento de formas: los «eccetrons».

LA EQUIDENSITOMETRÍA

Cuando se estudia la curva de ennegrecimiento de una emulsión fotográfica en los extremos de una placa negra y de una placa blanca en un objeto se obtiene una curva en forma de S, que sirve para definir el grado de «dureza» de la emulsión. Contratipando esta imagen negativa sobre una emulsión positiva se obtiene una curva igualmente en forma de S pero de pendiente invertida a la anterior. Superponiendo ambas curvas y proyectándolas sobre una emulsión contrastada se obtienen líneas finas que traducen los contornos de igual densidad del objeto. Podemos repetir estas operaciones y obtener de esta manera ya no la primera derivada, pero sí la segunda y la tercera.

Bajo la denominación de efecto Sabattier desde hace mucho tiempo se ha sabido hacer esta doble operación de una sola vez, sobre una única emulsión «solarizando» la superficie sensible durante el revelado (cf. p. 69).

La práctica de la equidensitometría necesita la utilización de emulsiones duras y de reveladores de fuerte contraste. Dado que este tratamiento hace aparecer no solamente los contrastes inherentes al objeto, sino también todos aquellos que podrían haber sido introducidos por «parásitos», tales como: cubreobjetos, motitas de polvo, su-

perposición de muestras, etc., es recomendable trabajar con grandes precauciones.

Efectivamente, la equidensitometría permite producir por vía fotográfica, sin equipos especiales, curvas de isodensidad que actualmente sabemos reproducir por vía optoelectrónica de forma mucho más costosa pero también con mayor seguridad en la interpretación de la imagen, gracias a las posibilidades de eliminación del fondo parásito (cf. p. 96). De esta manera se procede también en la equidensitografía electrónica. Este tipo de instrumento forma parte integrante de los microscopios cuantimétricos que se estudian en el capítulo IX, páginas 95 y 96.

V. — SÍNTESIS

LAS FOTOSÍNTESIS OCULARES Y FOTOGRÁFICAS

El microscopista maneja constantemente el tornillo de enfoque del microscopio, su ojo inconscientemente tiende a acomodarse, para hacer una síntesis cortical de lo que observa. Así, frecuentemente aparece decepcionado al contemplar las imágenes fotográficas que ha obtenido, dado que éstas únicamente han cogido una sección muy delgada de la preparación, la comprendida en la profundidad de campo del objetivo utilizado y que mide sólo unas decenas de micras en el caso de trabajar con objetivos de inmersión.

¿Cómo poder conseguir que la imagen fotográfica dé la mayor información posible de las observaciones visuales hechas directamente a través del ocular?

He aquí las reglas a seguir:

Inicialmente, debe escogerse la abertura numérica mínima, compatible con los detalles del objeto a observar, escoger el objetivo correspondiente y hacer la fotografía con un ocular que dé un aumento, sobre la película, teniendo en cuenta la ampliación, de 1/2 n veces los aumentos finales sobre el positivo tras un aumento de n veces.

Si la profundidad del objeto excede, sin embargo, la profundidad de campo del objetivo determinado debe procederse de la forma indicada a la fragmentación de tiempo de exposición en p fracciones iguales e intercalando entre estas p fracciones iguales imágenes obtenidas a mayor profundidad, llegando a cubrir con este sistema todo el grosor del corte.

Durante esta operación conviene no tocar el tornillo de enfoque de forma continua, sino por intervalos saltatorios, a fin de que cada imagen parcial sea lo más nítida posible durante toda la duración de su tiempo parcial de exposición. Se determinarán los intervalos de enfoque en función de la estructura del objeto (y no de forma arrítmica) centrando principalmente los detalles sobresalientes o importantes.

El tiempo de exposición será largo, del orden de varios segundos a varias decenas de segundo, el número p de niveles de enfoque será de dos a cuatro, pero en el caso de materiales muy contrastados puede sobrepasar estos tiempos. La figura 64 ilustra los resultados espectaculares obtenidos con este sistema sobre objetos con estructura tridimensional.

Con la práctica y una buena cámara automática, tras un ensayo de referencia, se adquiere rápidamente un cierto automatismo personal en la selección de los niveles de observación y los resultados obtenidos son tales que pronto se desechan otras alternativas de trabajo y se adopta este sistema.

Cuando el objeto es una esfera de pequeñas dimensiones, por ejemplo una espora o un grano de polen, los otros dos planos a enfocar son ex-

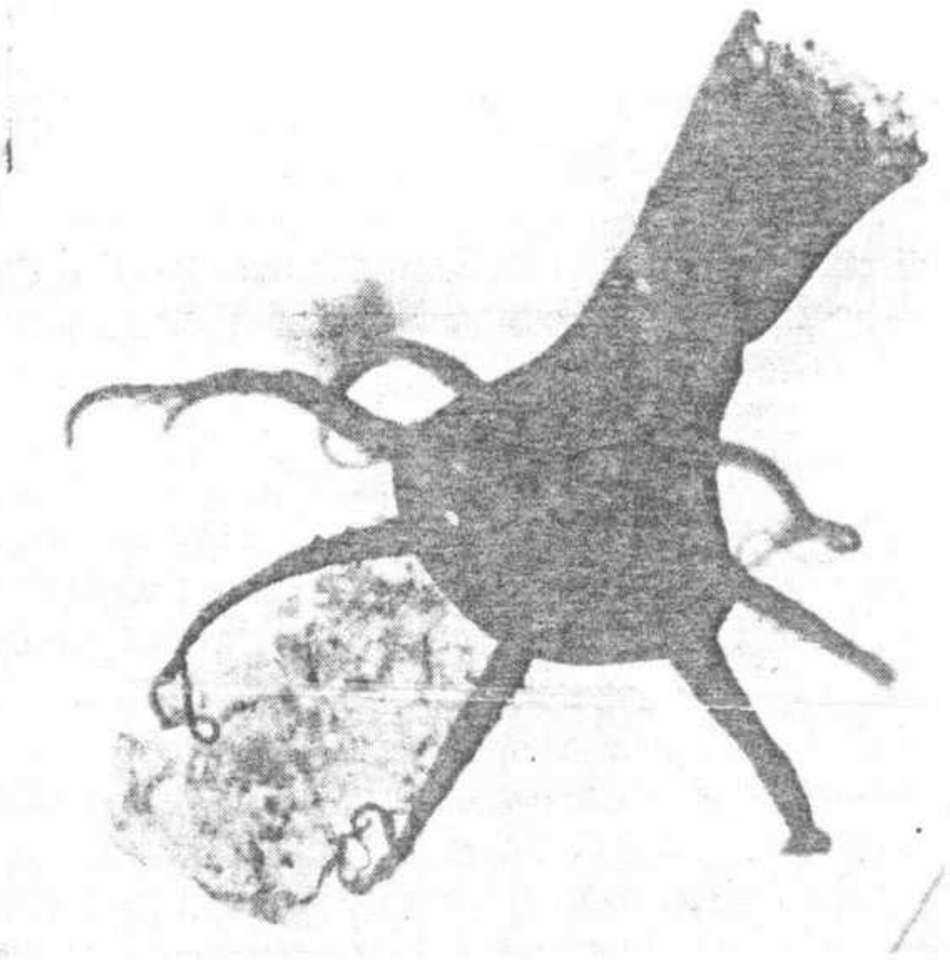


FIG. 64. — *Fotosíntesis por sobreimpresión según Vialandes:* Quitinomicete o Quitinozoario, *nanofósil del paleozoico inferior* (Ancyrochitina) Gr.: 300, tres poses con tres enfoques distintos han permitido obtener nítidamente, a la vez el cuerpo del fialosporangio y sus procesos en corona. Cliché M. Locquin.

clusivamente el plano ecuatorial y el plano tangencial al polo superior de la esfera.

Este sistema es excelente cuando los objetos son semitransparentes. No es aplicable a los objetos opacos y menos fácil de utilizar a la lupa binocular a aumentos débiles.

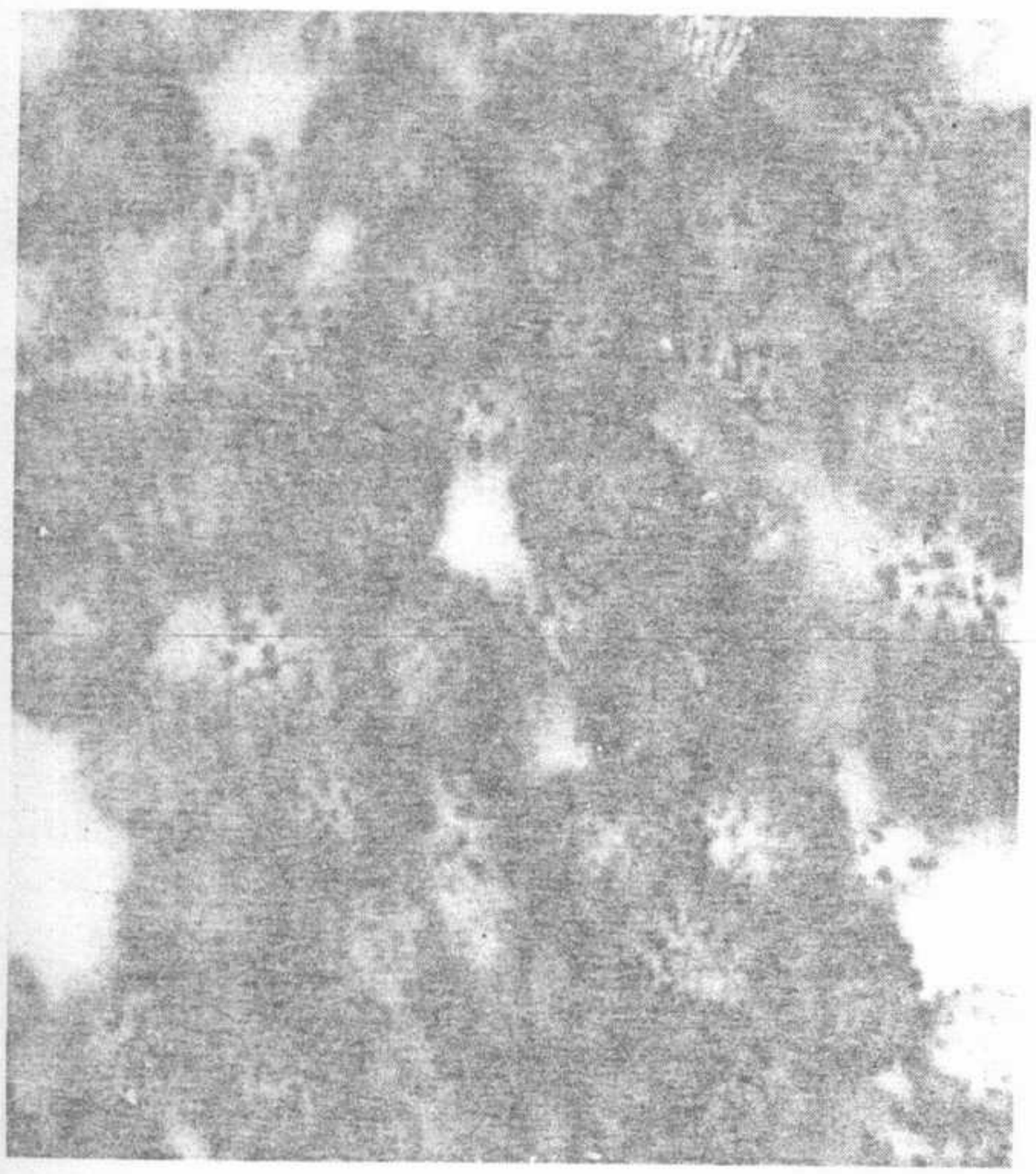


FIG. 65. — *Fotosíntesis por superposición de dos impresiones sobre una película delgada, con dos enfoques distintos: uno sobre el plano ecuatorial, el otro sobre el polo superior de la espora.* Permite observar simultáneamente el relieve esférico de esporas de 12 µm y la visibilidad de las ornamentaciones superficiales. Objetivo de inmersión, ON 1,30. Cliché M. Locquin.

LAS FOTOGRAFÍAS ESTEREOSCÓPICAS

Pueden obtenerse bien sea con un microscopio estereoscópico y una cámara de deslizamiento, alternativamente colocada en el sitio de los dos tubos de observación, o bien con un microscopio monoobjetivo y una platina cuadrada o teodolítica que permita inclinar al objeto alrededor de un eje sagital del instrumento entre las dos tomas, o también con una doble cámara especial (fig. 66).

LAS RECONSTRUCCIONES DE GRÁFICAS

Puede ser muy interesante reconstruir un objeto de tal manera que pueda leerse en profundidad, como si se tratara de un mapa geológico con sus curvas de nivel. Ello se puede hacer siguiendo la técnica de Lison con la ayuda de dibujos de los contornos de detalles significativos del objeto sobre una serie de cortes de parafina y apilando estos dibujos, o copiarlos sobre un único soporte.

Una variante interesante consiste en anamorfosar cada dibujo como si se observara a 45° para obtener seguidamente de la apilación una perspectiva de conjunto.

M. Locquin ha aplicado esta técnica a los cortes ópticos de muestras muy pequeñas y a los cortes utilizados en microscopia electrónica. La equidistancia escogida es la de 2 µm, lo cual quiere decir que únicamente se selecciona un corte entre otros muchos.

LAS RECONSTRUCCIONES PLÁSTICAS

Recortando los dibujos o fotografías obtenidas con la ayuda de las técnicas anteriores y pegándolas sobre cartulinas, a su vez recortadas y de grosores tales que representan la equidistancia de cortes multiplicados por el grosor escogido, pueden apilarse estos cartones para reconstruir el objeto en su volumen total aumentado. Estas operaciones de reconstrucción son facilitadas si se incluye, al mismo tiempo que el objeto, dos marcas coloreadas y dispuestas diagonalmente opuestas, pueden ser dos hilos de gelatina impregnada de tinta china.

LAS RECONSTRUCCIONES CINEMATOGRÁFICAS

Hemos visto cómo debe procederse para reconstruir objetos a partir de cortes reales o de dibujos de cortes. Puede semiautomatizarse el procedimiento, utilizando dos microscopios unidos por un tubo de comparación por superposición de imágenes, detrás del cual se coloca una cámara de filmación. Sobre el microscopio A se coloca el primer corte, encuadrado, señalado y después fotografiado; sin sacarlo se coloca sobre el microscopio B la segunda preparación que se superpondrá y cuadra con relación al primero iluminando los dos microscopios, después se apaga el microscopio A y se fotografía la imagen de B. Se repite la operación colocando una tercera preparación en el microscopio A, y así sucesivamente. De esta manera, tras haber conseguido una serie de clichés sucesivos, analizar a través de los cortes la progresión de un detalle vascular, por ejemplo, y poder lograr, tras fotografiar sobre papel, obtener verdaderas reconstrucciones gráficas o plásticas, eliminando de esta manera los engorros inevitables del dibujo. Si disponemos de un suficiente número de cortes se puede conseguir, proyectar cinematográficamente el resultado: se sumerge dinámicamente en el interior del objeto (fig. 72).

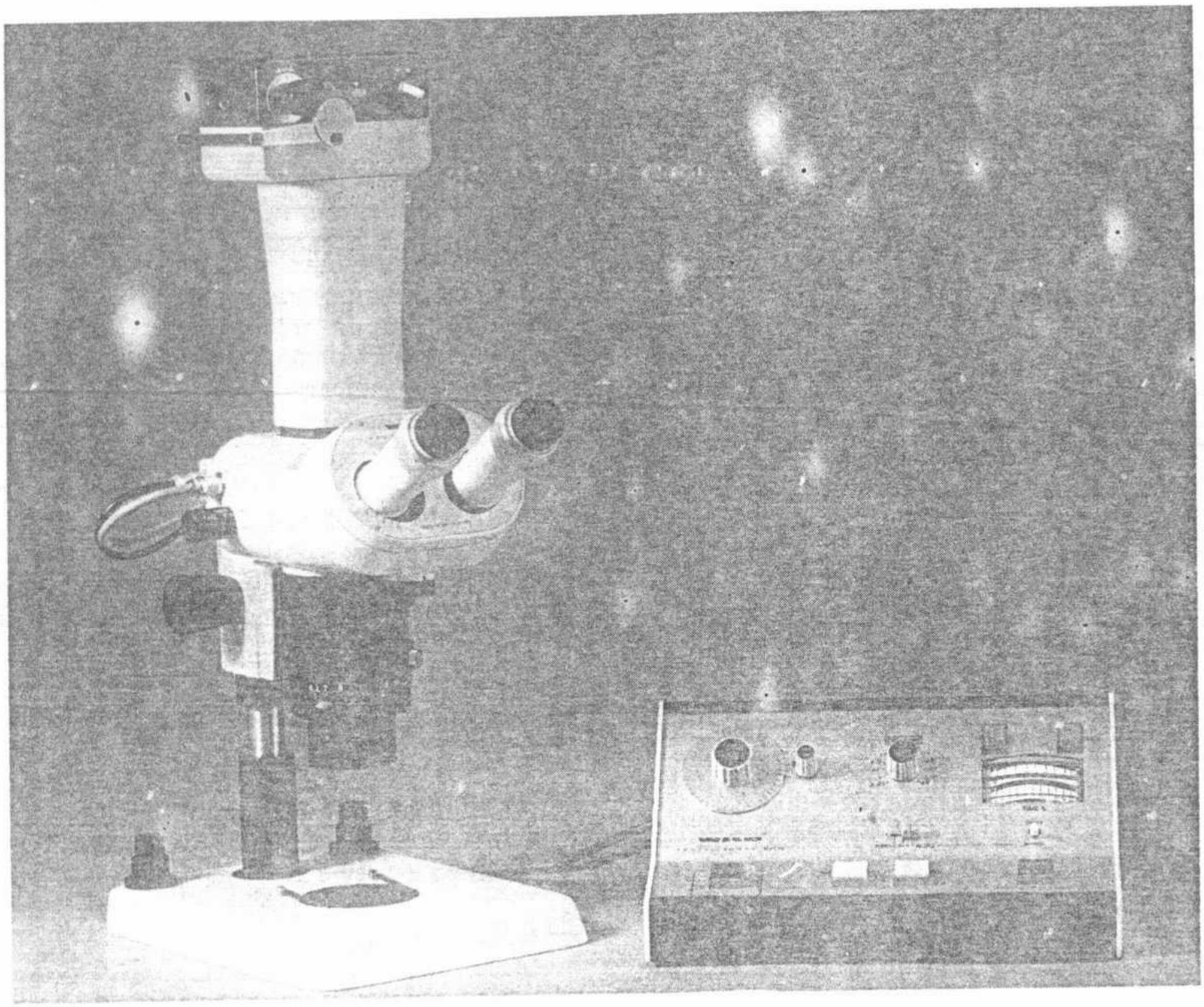


FIG. 66. — *Microscopio estereoscópico Wild con equipo de fotografía automático.* Documento Wild-Heerbrugg.

LA CINEMICROGRAFÍA

Ha tenido un nuevo interés después de haber puesto a punto sistemas ópticos, tales como el contraste de fases, permitiendo la observación *in vivo* de detalles intracelulares. Basta ver el partido que ha sabido sacar de esta técnica J. Dragesco, al filmar infusorios, para convencerse de ello.

Al igual que en cinemicrografía normal, puede registrarse un ritmo normal y proyectarlo al mismo ritmo o bien operar a distintos ritmos, a fin de acelerar o lentificar determinados movimientos durante la proyección. En microscopia es la aceleración que tiene mayor interés, dado que los crecimientos en los cultivos celulares son lentos y el crecimiento acelerado así artificialmente permite poner de manifiesto fenómenos inadvertidos por otros sistemas, como pueda ser la pinocitosis, filmada por Bessis en los leucocitos.

Para determinar el ritmo de toma de vistas, se medirá la duración global del proceso a filmar y estimaremos la duración deseada de la proyección: 20 segundos a 2 minutos. Sabiendo que proyectaremos la película a 16 imágenes por segundo si es muda o a 25-26 imágenes por segundo si está sonorizado o televisado, se calculará el número de imágenes a registrar en ese tiempo, de lo cual se deducirá el ritmo de temas de las vistas.

Los equipos de tomavistas, imagen por imagen *(Time lapse devices)*, son muy usados actualmente. Muchos de ellos efectúan diversas funciones atendiendo al tipo de programación que se les da: encendido del sistema de iluminación, exposición de la película, extinción de la lámpara y repetición de este ciclo a intervalos variables. Si las exposiciones son suficientemente próximas podemos omitir apagar la lámpara (fig. 68).

El trabajo en 35 mm tal como el usado J. Painlevé da resultados excepcionales pero es muy costoso. Los 16 mm son mucho más utilizados. El Instituto de Cinematografía de Göthingen (D) tiene un catálogo exhaustivo y publica *«La película de investigación»*.

El aspecto que hace referencia a la «emulsión» del procesado es idéntico al que tiene en fotomicrografía (cf. p. 63). Sólo hay un aspecto que difiere: la síntesis temporal ocular que fusiona físicamente las imágenes sucesivas; las imágenes de

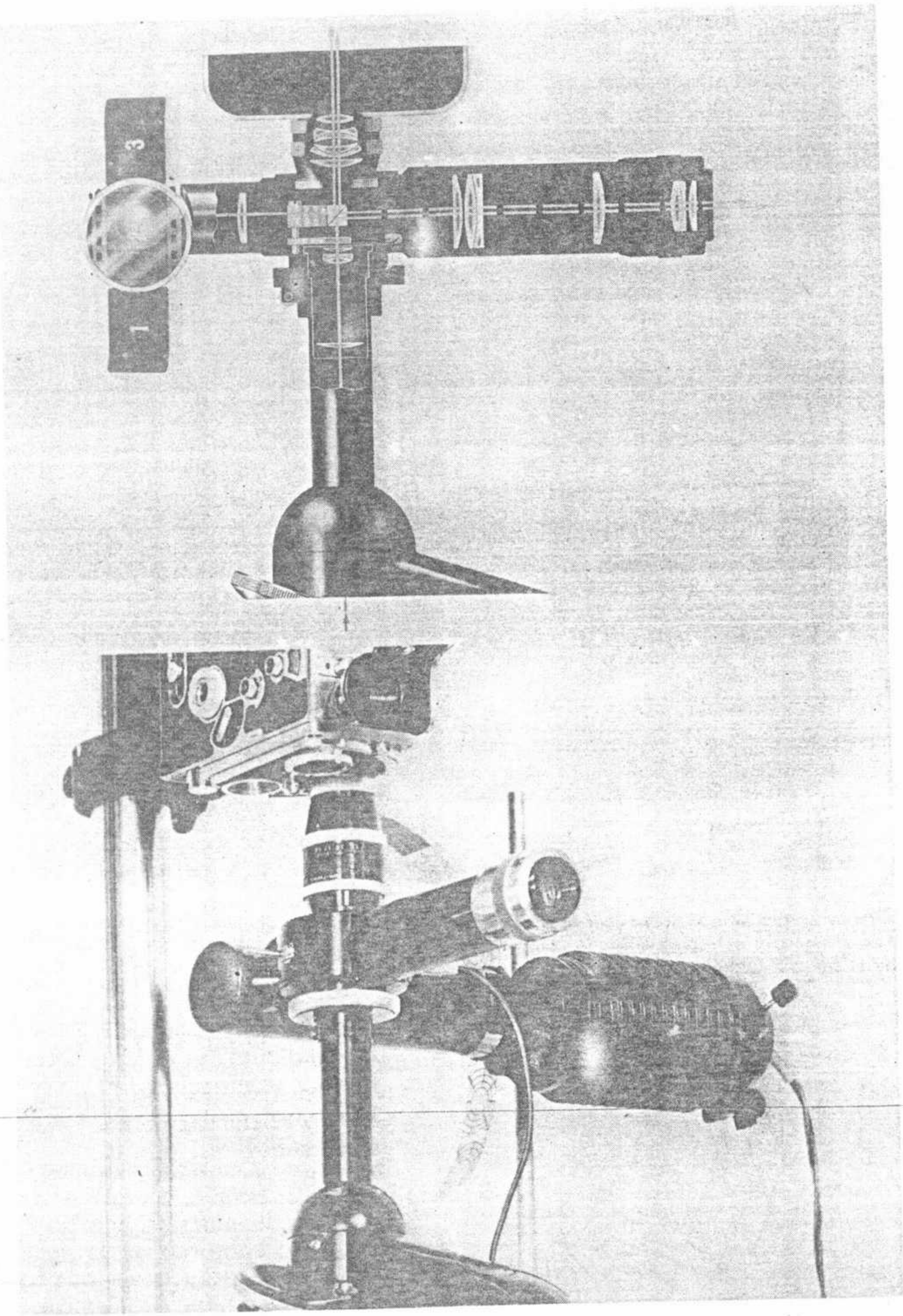


FIG. 67. — *Equipo cinemicrográfico con proyección de imágenes auxiliares sobre la película, corte y perspectiva.* Documento Wild-Heerbrugg.

proyección son siempre las mejores, mucho mejores que las imágenes fijas aumentadas.

La sensibilidad a la luz de las muestras vivas varía mucho según el tipo de material de que se trate. Siempre deben protegerse al máximo del calentamiento y de los rayos ultravioleta, trabajando con filtros anticalóricos y anti-U.V., siendo éstos extraordinariamente eficaces.

EL DIBUJO EN MICROSCOPIA

Tres métodos permiten obtener dibujos al microscopio: el ocular cuadriculado, la proyección, la superposición de dos imágenes, la de la preparación y la del lápiz, con la ayuda de una cámara clara o con un tubo de dibujo.

El ocular cuadriculado es un procedimiento

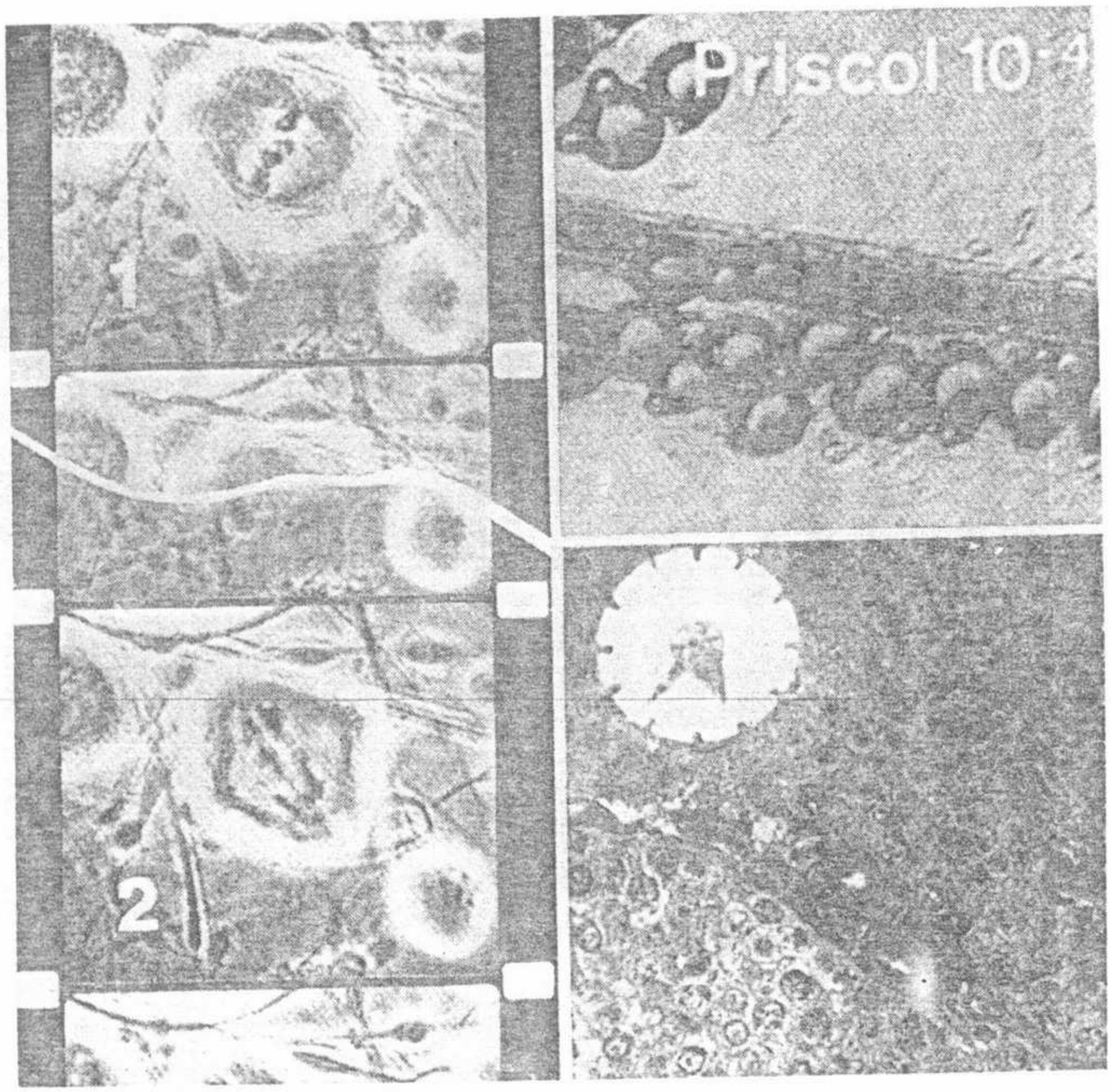


FIG. 68. — *Dos imágenes de una secuencia mostrando una mitosis con proyección de una cifra sobre la película a la izquierda; a la derecha y arriba, proyección de un texto; abajo, proyección de un cronómetro, con la ayuda del dispositivo de la fig. 67.* Documento Wild-Heerbrugg.

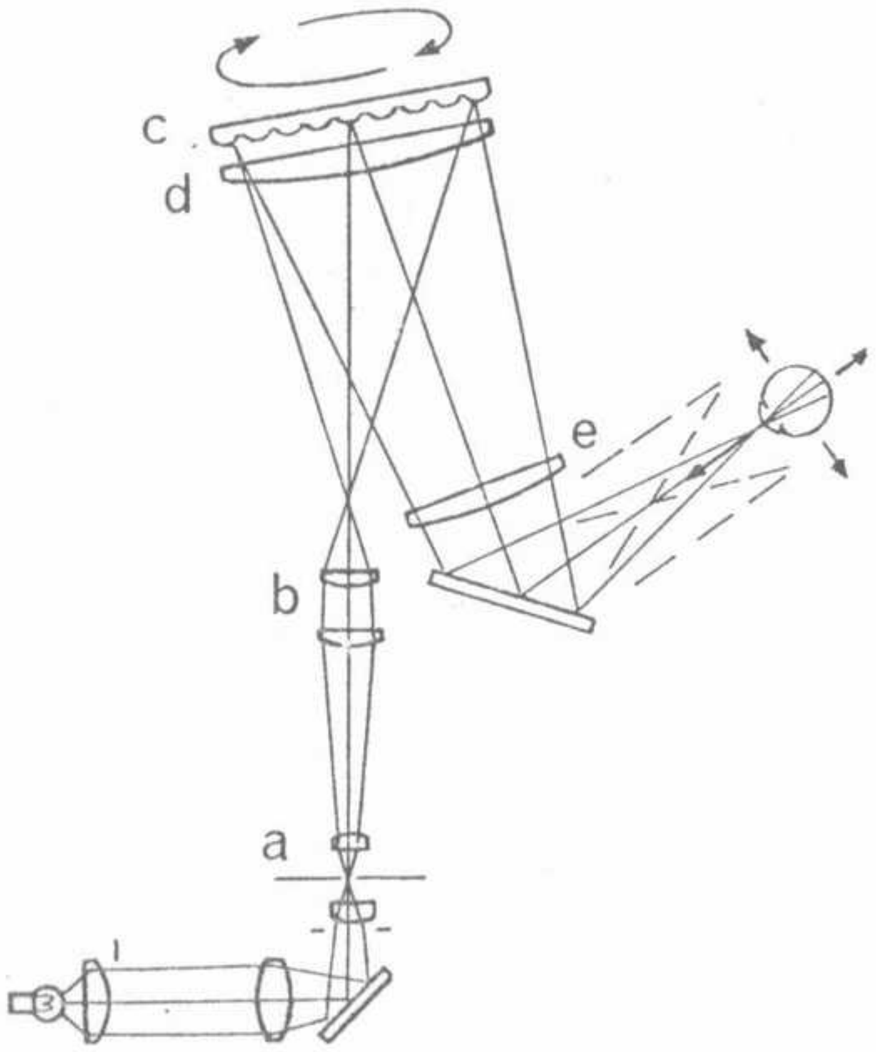


FIG. 69. — *Para incrementar la pupila de salida del microscopio y eliminar las consecuencias de los defectos internos del ojo, un espejo revestido de microlentes gira a gran velocidad en el plano de la imagen real proyectada.* Documento Wild-Leitz, Francia, Rueil-Malmaison.

muy conocido por los microscopistas; superponen al dibujo que quieren hacer un ocular micrométrico cuadriculado. El procedimiento a seguir es largo y relativamente poco preciso, pero es el menos costoso.

La proyección sobre la mesa de trabajo, al lado del microscopio, permite, si está situado el conjunto en una sala oscura o a la penumbra, reseguir el contorno de la imagen directamente sobre el papel, a la vez que fotografiarla sobre papel fotográfico, en negativo.

La superposición de dos imágenes con la ayuda de un dispositivo óptico adecuado, que durante muchos años fue la «cámara clara», actualmente transformada en un «tubo de dibujo», permite efectuar un trabajo mucho más cómodo y en condiciones de máxima estabilidad. Filtros grises neutros, escamotables, permiten regular la intensidad lumínica del microscopio con respecto a la iluminación del papel. La iluminación en este sistema de dibujo es crítica. La observación con los tubos de dibujo permite aplicarlos en tubos binoculares, lo cual no es posible cuando se trata de la cámara clara.

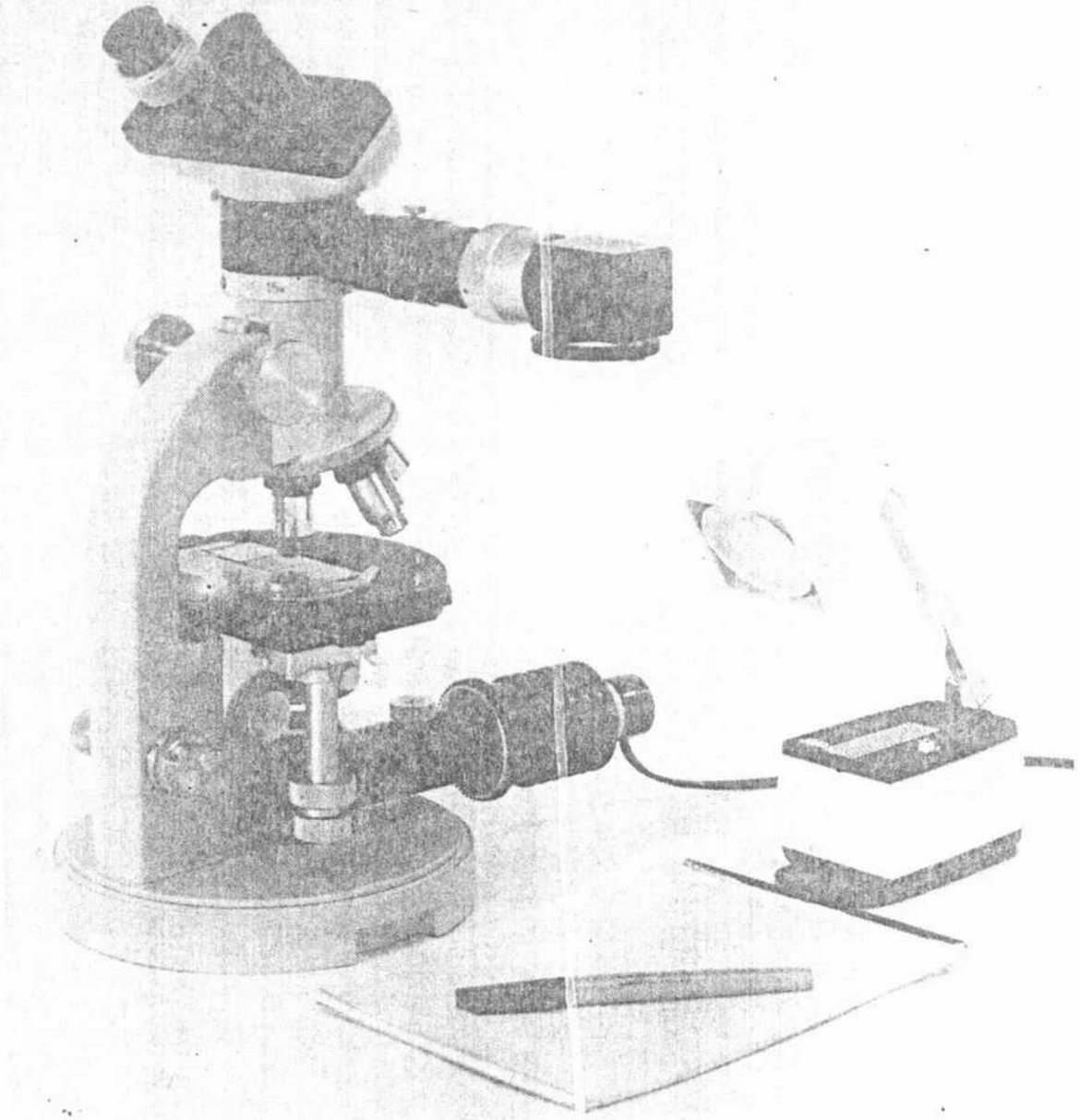


FIG. 70. — *Microscopio Wild equipado con un tubo para dibujar (cámara clara) proyectando en el tubo de observación la imagen de la superficie del papel sobre el que se dibuja, lo que permite seguir con el lápiz los contornos del objeto observado.* Documento Wild-Heerbrugg.

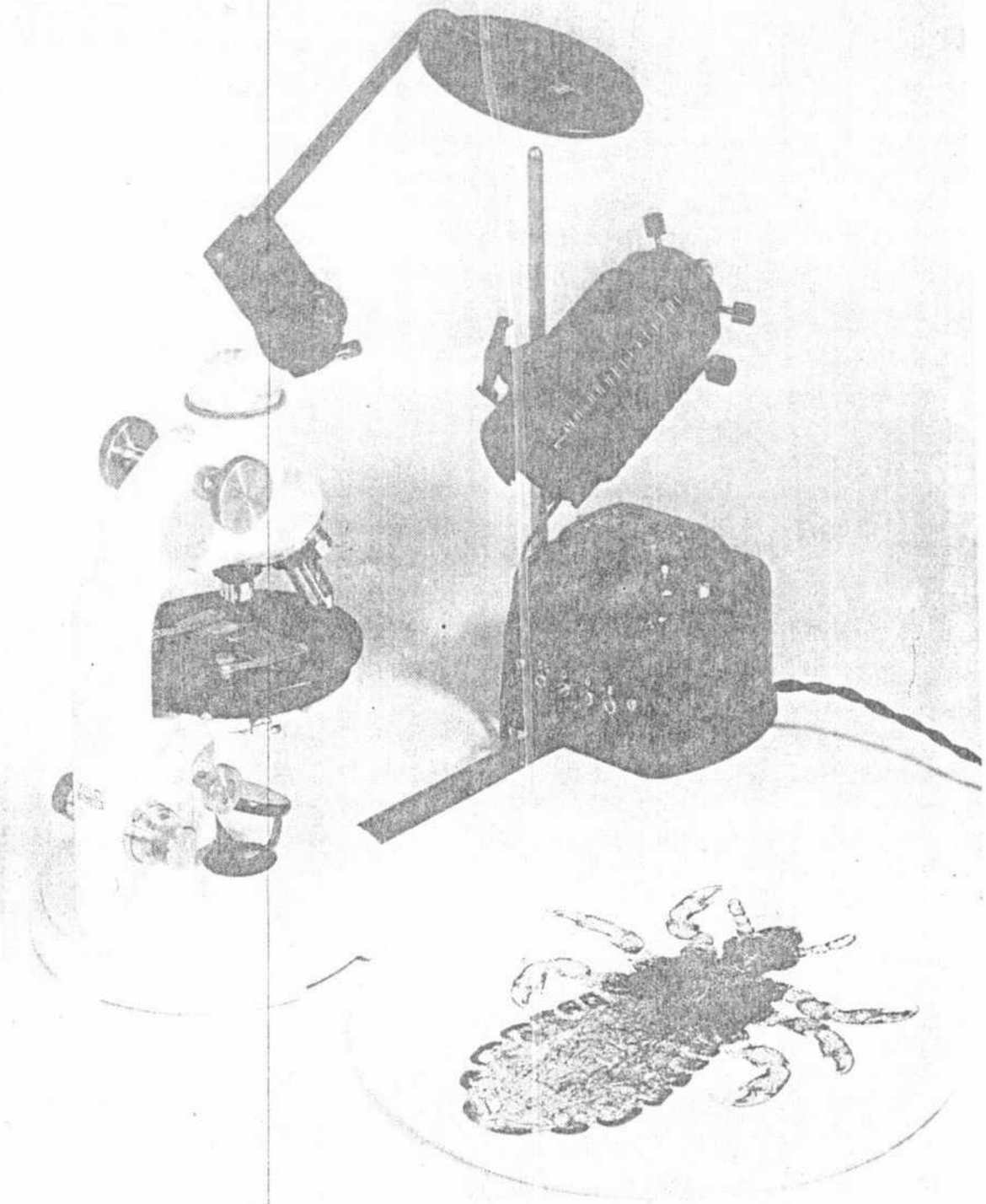


FIG. 71. — *Espejo para dibujar y proyectar.* Con este sistema se debe trabajar a oscuras mientras que con la cámara clara de la fig. 70, no. Documento Wild-Heerbrugg.

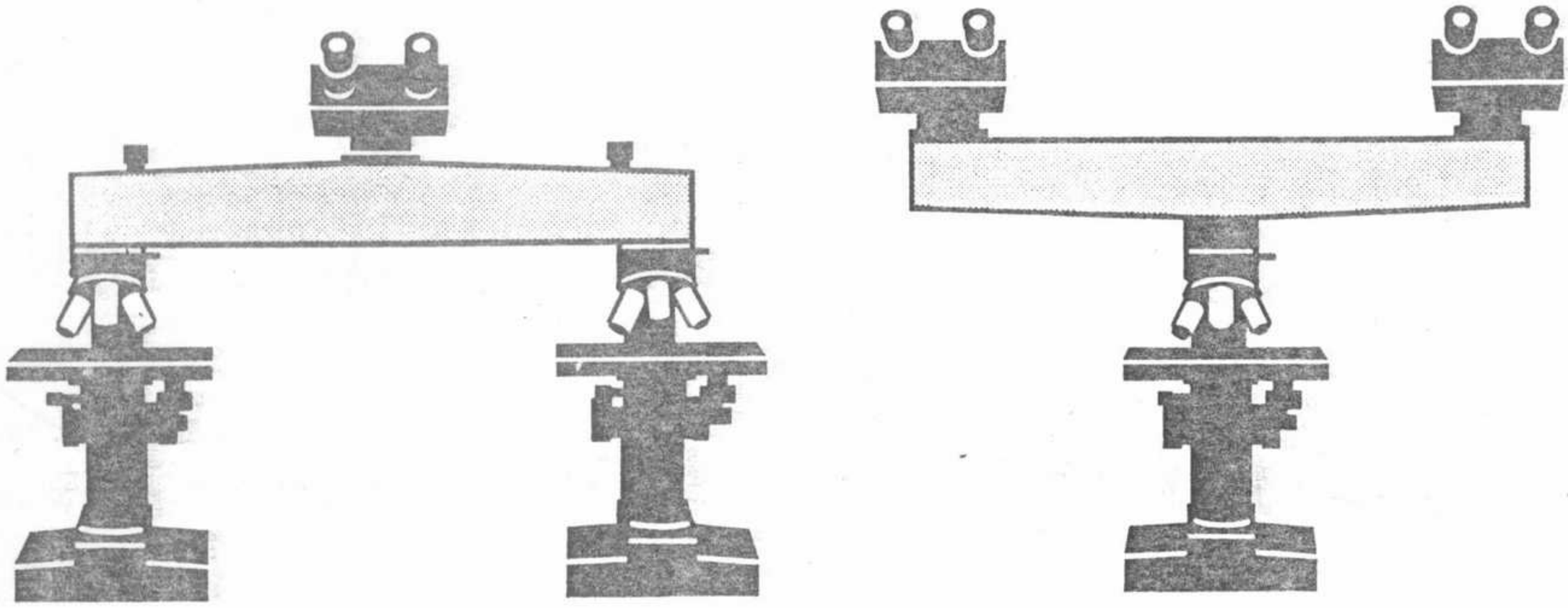


FIG. 72. — *Tubos de comparación a izquierda y de demostración a la derecha.* Documento Leitz-Wetzlar.

LOS ARTEFACTOS

Se denominan «artefactos» las estructuras artificialmente creadas por el operador en cualquiera de las manipulaciones que lleva a cabo durante el procesamiento de la muestra, desde la fijación hasta el montaje.

Los artefactos pueden tener múltiples orígenes, lo que determina que en ocasiones su apreciación sea difícil. Es una larga práctica de observación la que permite rápidamente vislumbrar los artefactos. Las contaminaciones generales de tipo accidental son las más fáciles de suprimir, dado que no se repiten en el tiempo, mientras que los artefactos de técnica, debidos a la manera de proceder en la técnica se van reproduciendo a no ser que se tomen una serie de precauciones. Es la razón por la que un hecho microscópico no puede considerarse como estabilizado ni concluyente si no se observa tras la aplicación de dos técnicas diferentes como mínimo.

Determinados artefactos que constantemente se repiten pueden considerarse como específicos de determinadas estructuras.

VI. — MEDICIONES

MÉTODOS DE MEDICIÓN

Si durante muchos siglos el microscopio ha sido ante todo un aparato destinado a la observación cualitativa es normal que haya evolucionado hacia la cuantitativa a medida que los requerimientos científicos así lo reclamaban. Dado que esta evolución se ha visto condicionada por las necesidades inducidas por dichas ciencias, ha sucedido de forma paralela al avance tecnológico del instrumento, si bien éste ha proseguido su evolución hacia el sentido de mejorar la calidad de la imagen, objetivo principal del microscopio. Este manual, inspirado por su vocación biológica general, pretende dar a conocer no solamente las técnicas de medición más usuales, sino aquellas que se han diseñado para casos muy concretos y que en su momento tuvieron interés y pueden volver a tenerlo.

Mediciones de longitudes

Sin hacer referencia a microscopios especiales, denominados «de medición», generalmente diseñados para las ciencias metalúrgicas o industriales, expondremos los métodos utilizados generalmente para efectuar mediciones de longitud y aplicables a todos los modelos de microscopios biológicos.

Ante todo debemos hacer una consideración previa: al escoger los aumentos útiles debe adoptarse un compromiso entre dos hechos contradictorios, al menos aparentemente: si se escoge un gran aumento debe tenerse en cuenta que se disminuye la precisión de los trazos, de los bordes de las estructuras como consecuencia de la aparición de franjas de difracción y del escaso contraste de algunos objetos; la disminución del poder de resolución es un obstáculo. En la práctica usa-

mos la siguiente regla estadística: un aumento igual o superior a 1000 para las estructuras inferiores a 10 micrómetros, de unos 100 aumentos para las estructuras próximas a 100 micrómetros y finalmente igual o inferior a 10 para objetos del orden del milímetro.

Los micrómetros. — Son de dos tipos: los *micrómetros objetivos* que permitirán calibrar los *oculares micrométricos;* únicamente éstos servirán para efectuar mediciones. Los micrómetros objetivos también sirven para calibrar los otros sistemas de medición lineal aplicados al microscopio, como veremos a continuación. Pero es la correlación existente con los oculares micrométricos que permite comprender mejor su función y su mecanismo. Algunas casas constructoras de microscopios habiendo estandarizado sus instrumentos ofrecen oculares de medición, micrométricos con un factor de corrección dependiendo de los aumentos del objetivo con el que se trabaja, por lo que se puede obtener de forma automática el valor en micras de una unidad de la escala de medición. Recomendamos efectuar al menos una comprobación de este hecho para verificar estos datos; hemos constatado que en un cambio de diseño del constructor este factor aparecía modificado sin que el usuario fuera advertido de ello, sobre todo si la compra del instrumento no coincide con el momento en que salió el aparato.

Los oculares micrométricos u oculares de medición, deben ante todo, estar calibrados no sólo por cada objetivo, sino también por la presencia de cada accesorio, en el que la interposición sobre el trayecto de los rayos lumínicos modifique el tamaño total del aparato. Generalmente, estos accesorios tales como los tubos binoculares o trioculares, tubos fotográficos intermediarios, tubos alargables, tubos de dibujo, etc., llevan sobre sus monturas algún indicativo del factor de aumento que introducen al sistema óptico; sus valores oscilan entre 1,25 a 1,5 salvo en el caso de los que pueden oscilar de 0,5 a 2. De paso, debemos decir que no somos partidarios de utilizar en los microscopios de medición e incluso en microscopia general, variaciones continuas de aumento, tipo «zoom». Con estos aparatos el microscopista nuncá sabe a cuántos aumentos está trabajando realmente en un momento dado. Puede cometer errores de medición importantes sin darse cuenta de ello, en caso de que no estandarice sus condiciones de trabajo. Con un sistema de variación de aumento constante no puede hacerlo cómodamente, a no ser que trabaje a mínimo aumento o a máximo aumento, despreciando las posiciones intermedias. Pero en ambos casos está lejos de trabajar en las condiciones óptimas de su objetivo, sobre todo si se trata de un objetivo de gran aumento.

La operación de calibrado consiste en determinar, por comparación con la escala conocida, la del micrómetro objetivo, el valor en micras de una división de la escala del ocular micrométrico. Para ello, el micrómetro objetivo, que generalmente es portador de una escala de 1 mm dividido en 100 partes con unas subdivisiones más delgadas, se coloca sobre la platina del microscopio, iluminada convenientemente (no siempre es fácil, dado que las rayas son muy tenues) y se enfoca adecuadamente, se saca el ocular y se introduce el ocular micrométrico. Se hacen coincidir las dos escalas, la del objetivo y la del ocular. Si el ojo del observador tiene astigmatismo, debe mantener sus gafas puestas y efectuar con ellas el enfoque, para hacer el calibrado; una vez hecho puede sacárselas, sin que ello influya en la precisión de las medidas que vaya a hacer (fig. 73). Tras haber hecho este reglaje se introduce el ocular de medición en el tubo del microscopio y se enfocan correctamente sobre el micrómetro objetivo. Éste generalmente se ha obtenido por sistema fotográfico; cuando se observa a grandes aumentos aparece como una nebulosa formada por los granos de plata cuya densidad decrece del centro a la periferia del trazo, lo cual en ocasiones dificulta un perfecto calibrado. Si bien la práctica, como en todas las cuestiones de tipo técnico, suple este inconveniente. Moviendo el ocular micrométrico y desplazando adecuadamente la preparación se hace coincidir el extremo de la escala de la preparación con el extremo de la escala del ocular micrométrico. A grandes aumentos, uno de ellos es mucho más ancho que el otro,

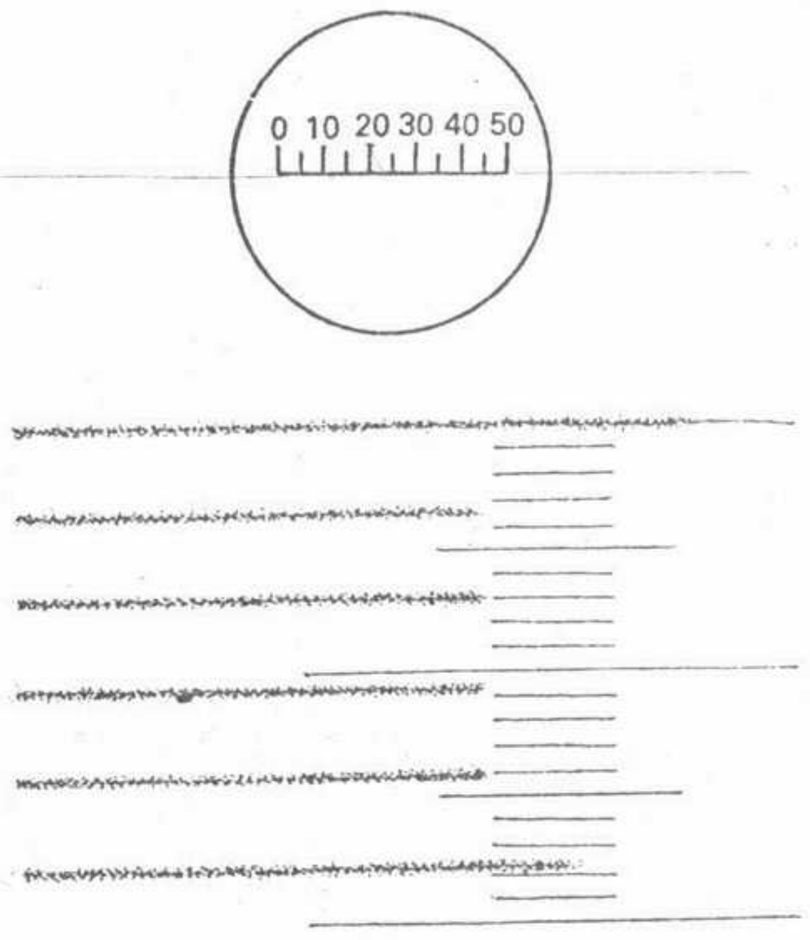


FIG. 73. — *Micrómetro ocular en la parte superior y calibrado del mismo con ayuda del micrómetro objetivo.* En este esquema observado a 500 aumentos, siete divisiones del ocular micrométrico corresponden a dos divisiones del micrómetro objetivo, es decir 20 µm; por lo que el valor de una división del ocular será de 2,857 µm.

por lo que se coloca la raya del ocular micrométrico en el centro de la del objetivo. Se observan detenidamente ambas escalas y se hace coincidir al menos una raya de una escala con la de otra escala, de la forma más exacta posible. Si *a* es el número de divisiones del ocular micrométrico y *b* el número de divisiones del micrómetro objetivo y si *f* es el valor en micrómetros de una división de esta última, lo cual viene generalmente grabado en la montura de la preparación; el «valor micrométrico» *m* de la escala ocular utilizada en estas condiciones será igual a:

$$m = \frac{b}{a} f$$

A título de ejemplo, si para una combinación óptica dada encontramos que 20 divisiones de 10 µm corresponden a 60 divisiones oculares, el valor micrométrico será en este caso de 3,3 µm. No sabríamos cómo aconsejar la conveniencia de establecer para cada microscopio una tabla de valores al trabajar con las distintas combinaciones ópticas, división por división, aumento por aumento y disponerla en un sitio bien visible. No es necesario decir que entre el calibrado y las medidas los parámetros no deben cambiar: ni la longitud mecánica del tubo, ni el tubo intermediario si existe, ni el factor de incremento de aumentos, ni evidentemente el objetivo. Cuando se cambia un objetivo por otro, aunque sea portador de las mismas indicaciones de aumento sobre su montura, siempre es conveniente calibrarlo nuevamente con el ocular micrométrico, verificarlo y eventualmente hacer las correcciones pertinentes.

El mismo sistema de calibrado puede utilizarse para el ocular de proyección o para un aparato de dibujo, pero en ambas situaciones, así como en el caso del calibrado fotográfico, vale más prescindir de la escala del ocular y adquirir la costumbre de trabajar con una regla separada, colocada en la esquina de un dibujo o en el extremo de la película, directamente la escala del micrómetro objetivo sin olvidar su valor; generalmente es de 10, 100 o 1000 µm.

Una vez calibrada la escala del ocular micrométrico, para medir cualquier estructura o célula, bastará superponer sobre la preparación la escala del ocular, con la precaución de hacer coincidir una división larga de la escala, del inicio o del final, sobre la estructura a medir y contar cuántas divisiones abarca; seguidamente, se consulta el cuadro de equivalencias y sale automáticamente en micrómetros el valor de la medida real de la estructura. Puede diseñarse una regla graduada en micrómetros para combinación óptica y utilizarla como si se tratara de un centímetro.

Desde hace muchos años, para mejorar la fiabilidad de las mediciones, se ha propuesto la utilización de oculares especiales denominados «oculares micrométricos a tambor», en los que un hilo móvil, cuyo desplazamiento es controlado por un tornillo graduado puede ser desplazado por el observador. La lectura del desplazamiento es sustituida por la de las divisiones de la escala. Este tipo de ocular es ampliamente utilizado en los aparatos industriales y metalográficos, mucho más macizos y estables que los microscopios biológicos. Cuando se usa habitualmente nos damos cuenta, rápidamente, por muy ligera que tengamos la mano, de que el tubo microscópico experimenta una deformación elástica cuando se manipula el botón del ocular micrométrico y que paulatinamente se va perdiendo precisión, sobre todo a grandes aumentos, por lo que resulta mucho más ventajoso trabajar con el microscopio biológico corriente y portador del ocular micrométrico. La adición de un «contador automático», con medición asegurada por miliamperímetro, amplifica todavía más este error. Este tipo de aparato debe ser pues reservado a aparatos muy estables, generalmente de tipo invertido, o industrial, o cuando se trabaja a pocos aumentos; pero en este último caso, ¡por qué aumentar así, de esta forma ilusoria, la precisión que en este caso será limitada por otros numerosos factores!

Para mejorar la precisión del estativo, como para poder hacer mediciones sobre los objetos móviles o para medir formas complicadas, dos marcas inglesas han imaginado y diseñado sistemas de «desdoblamiento» de imágenes, las dos imágenes tienen colores complementarios, rojo y azul en general.

Dado que el desdoblamiento se hace en la superficie de todo el campo y que para efectuar la medición, el observador procura conducir a la tangente las dos imágenes coloreadas de distinta manera para, posteriormente, leer el valor del desdoblamiento sobre el tambor del enfoque, imaginamos fácilmente que toda flexión del estativo como la del desplazamiento del objeto, no influya sobre la lectura ni sobre la precisión del instrumento.

Cada vez resulta más rápido hacer un contaje por clases alrededor de un valor prefijado puesto que, en el campo, las imágenes tangentes saltan a la vista, sea cual fuere la posición de los objetos. Permiten asimismo hacer mediciones de excentricidad sobre estructuras casi circulares con una platina giratoria o bien haciendo girar el ocular. Cuando se trata de objetos de tamaño muy diminuto, para los detalles de objetos, para los objetos de contornos muy irregulares y angulosos, son los únicos aparatos que podemos aconsejar para efectuar mediciones. Incluso la medición sobre el cliché fotográfico da un valor ligeramente inferior, dado que la apreciación de la posición de los bordes del objeto depende de su contraste y de la curva de ennegrecimiento de la emulsión en su revelador.

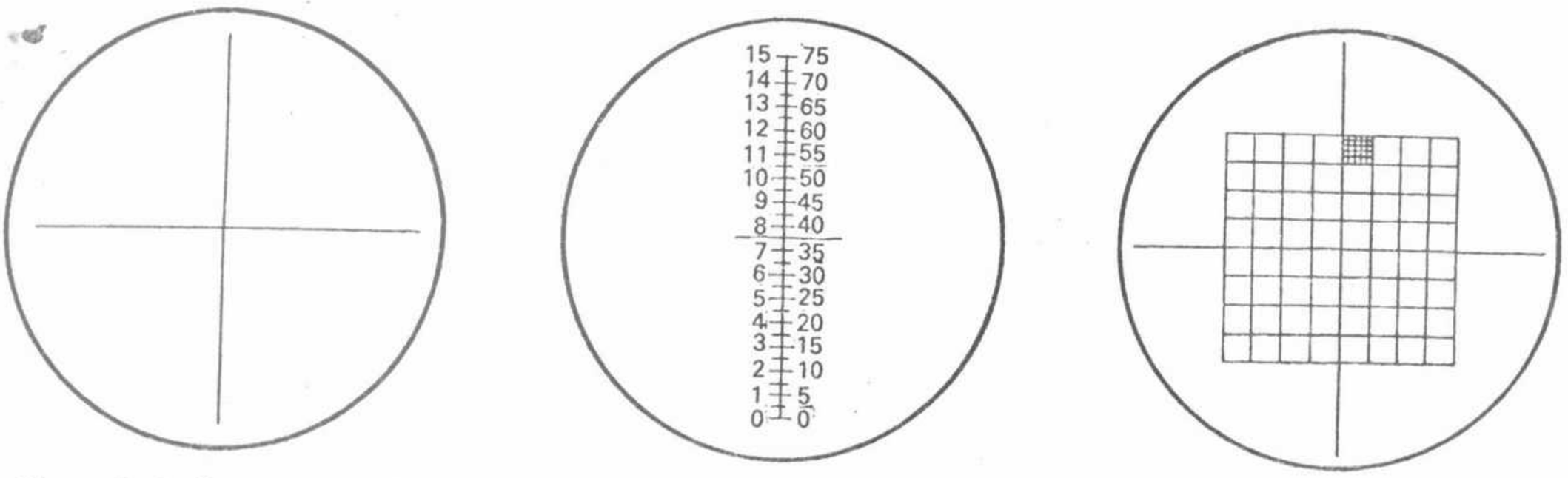


FIG. 74. — *Retículos y cuadrículas.* Retículo en cruz para el microscopio de luz polarizada. Doble escala de medidas. Retículo cuadriculado para las numeraciones.

Medidas de superficie

Se hacen electrónicamente con microscopios cuantimétricos (ver p. 96). Si no se dispone de estos costosos aparatos hay cuatro posibilidades de llevar a cabo dichas mediciones:

1. Dibujo del objeto a un aumento escalonado, sobre un papel milimetrado o recubierto de un papel cebolla, contaje del número de milímetros cuadrados contenidos en el interior de los contornos de la estructura u objeto, convertidos en micrómetros cuadrados.

2. Dibujo o fotografía del objeto a aumentos escalonados; seguidamente, se procede a recortar cuidadosamente los dibujos y se pesan con una balanza de precisión para comparar con el peso de una superficie conocida del mismo papel, en las mismas condiciones higrométricas y tras haber verificado su homogeneidad por recortes de rectángulos de distinta forma pero de igual superficie. Cuando se utiliza la vía fotográfica se recomienda efectuar el tiraje de los positivos sobre un papel armado, sin trama, como el que se usa para fotogrametría o en cartografía fotográfica. Los papeles corrientes tienen coeficientes de retracción variables y sobre todo muy desiguales: en el sentido de la fibra o perpendicularmente a ella.

3. Utilización de un ocular con retículo cuadriculado, con contaje del número de cuadrados por el factor de superficie. Es con mucho la peor técnica, dado que si los cuadrados son pequeños, enmascaran la imagen y se cometen errores al contabilizarlos y si los cuadrados son grandes, muchos de ellos contienen únicamente una parte del objeto, de ahí surge una importante fuente de errores.

4. Para la medición de superficies, la utilización de un planímetro con ruleta integradora, que ha sido diseñado de dos formas distintas: bien sea la proyección, la fotografía o el dibujo del objeto, bien sea sobre la imagen aérea incluso de la que se forma en el ocular. Es la primera manera de proceder que es de lejos la más cómoda, la más precisa y la menos costosa.

Las cuadrículas y los retículos. — Las cuadrículas son imágenes grabadas sobre un disco plano en vidrio colocado habitualmente en el plano focal de la imagen de un ocular. Estas imágenes pueden ser de forma y de dimensiones cualesquiera. Se denominan *retículos* cuando el grabado está formado por una malla de líneas.

La figura 74 representa algunas cuadrículas y retículos. Su modo de empleo está indicado en el texto.

Los retículos pueden estar montados fijamente o sobre una montura móvil, regulable desde el exterior, mediante un tornillo micrométrico situado en un *tambor* graduado.

Estos oculares a tambor únicamente pueden usarse a pequeños aumentos, o medianos aumentos y en estativos de una gran estabilidad. Dan excelentes resultados cuando están montados sobre microscopios de estativo macizo, tipo invertido. Sobre los microscopios derechos el simple contacto de la mano es suficiente para provocar una flexión del estativo, amplificado por la disposición del brazo, por lo que queda automáticamente anulada toda precisión teórica del instrumento de medición.

Medidas de volúmenes y de pesos

Superponiendo dibujos o fotos tomadas a intervalos, de grosor controlado e iguales, moviendo el tornillo micrométrico del microscopio pueden obtenerse lo que se llama «reconstrucciones gráficas» aumentadas del objeto, medir su peso pesando las secciones de papel y multiplicando las superficies por un factor de densidad obtenido a partir de la estructura en fotos o bien en peso seco. M. Locquin ha aplicado estos métodos de reconstrucción gráfica al estudio de objetos de unos diez micrómetros no de cortes micrométricos sino «cortes ópticos».

Medición de ángulos

Pueden hacerse bien sea con la ayuda de un ocular denominado «goniométrico», mediante una platina giratoria graduada y de un ocular con retículo en cruz, o sobre dibujos y fotos con la ayuda de un transportador. Este tipo de mediciones no presenta ninguna dificultad particular si no se desean mediciones más precisas que 1 grado (fig. 75).

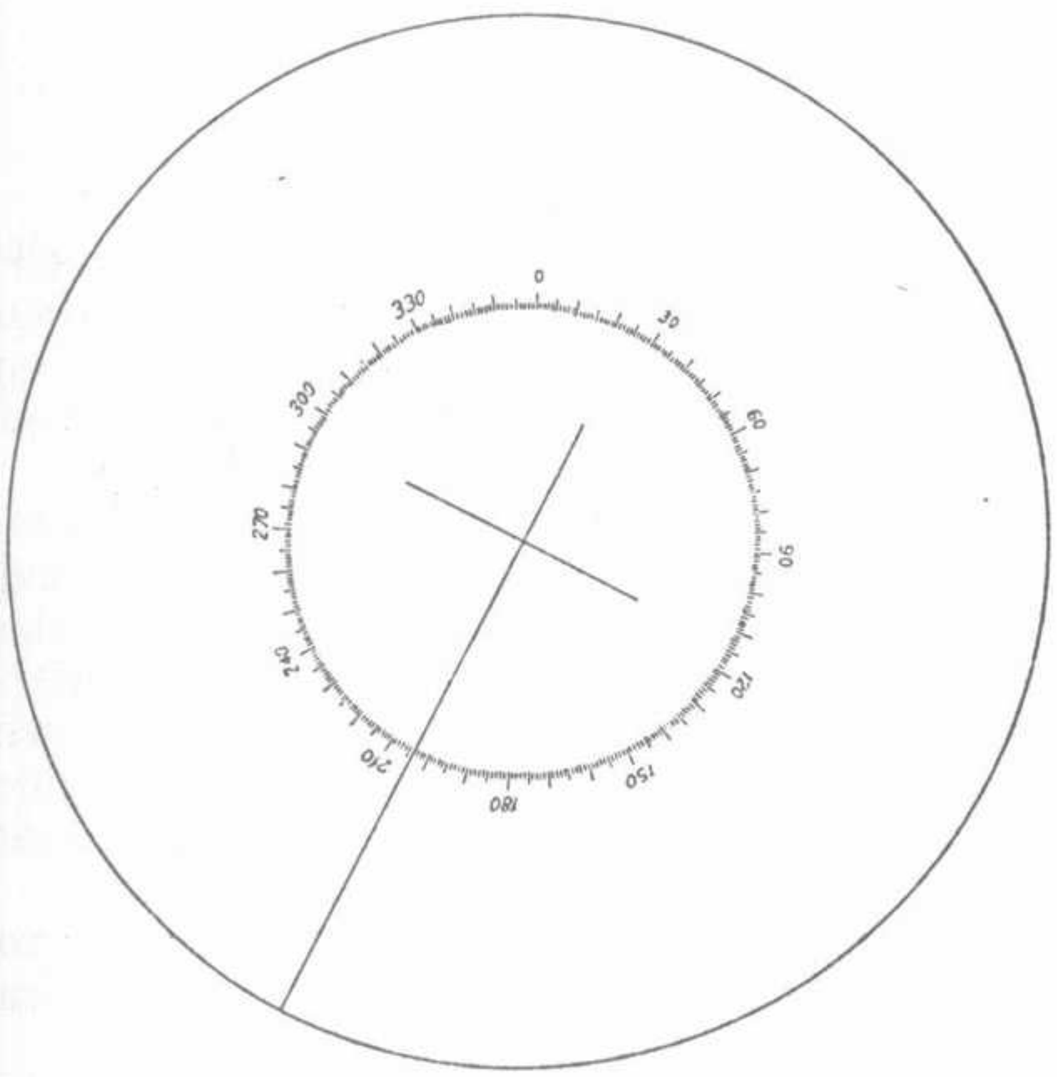


FIG. 75. — *Ocular goniométrico:* visión del retículo; el círculo dividido es fijo y la cruz es móvil. También puede emplearse un retículo fijo y la platina giratoria dividida de un microscopio de luz polarizada para efectuar la medida de los ángulos.

Medición de profundidades

Denominamos «profundidad» de un objeto en microscopia a su «espesor» a lo largo del eje óptico, es decir, perpendicular al plano de observación. La precisión de estas mediciones depende de la imprecisión del punteado en profundidad, dado que al menos una de las caras del objeto es observada a través de todo su grosor, de la determinación precisa de su índice de refracción y de la precisión del tornillo micrométrico o del movimiento del microscopio. La determinación precisa de los índices es estudiada con detalle en las páginas 96-98. El centrado con el tornillo micrométrico introduce en general una no linearidad en su funcionamiento. Por lo que conviene, antes de efectuar cualquier medición, estudiar enfoques sucesivos a lo largo de su recorrido y comprobar sus irregularidades. Es por esto que los que deben efectuar a menudo mediciones de profundidad prefieren utilizar microscopios especiales, sobre los que se montan uno o tres micrómetros a cuadrícula, midiendo directamente los desplazamientos de la platina, es decir, del objeto, el operador efectúa las mediciones y hace directamente las lecturas en micrómetros, tras sustracción del número de partida al número de llegada.

Para las mediciones en profundidad, la corrección a efectuar en función del índice es la siguiente: si se trabaja con un objetivo a seco, debe multiplicarse la lectura por el índice de refracción del medio de montaje; si se trabaja con inmersión, deberá multiplicarse por la relación $\frac{n}{n'}$ en la que n es el índice del objeto y n' el índice del medio de montaje (fig. 76).

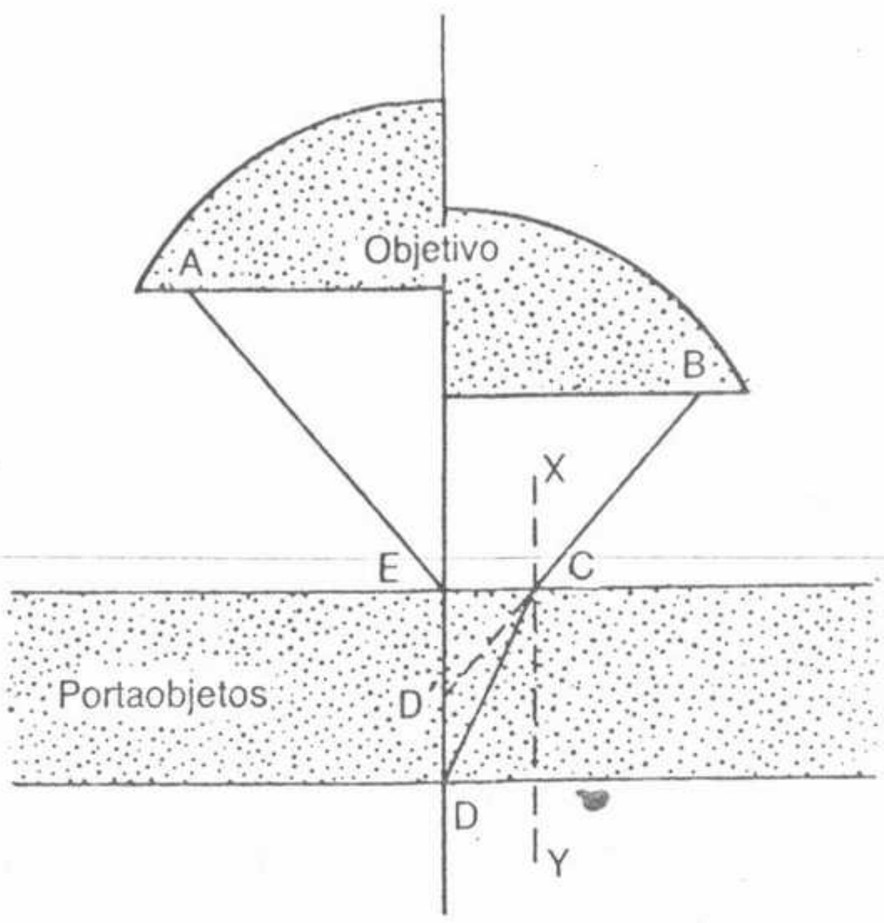


FIG. 76. — *Corrección necesaria para la refracción cuando se mide el grosor de una lámina con un objetivo en seco.* La distancia enfocada ED' es menor que el grosor real ED.

VII. — TÉCNICAS ESPECIALES

LA LOCALIZACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS

Es muy importante poder volver a encontrar rápidamente un objeto sobre una preparación permanente.

A continuación, indicamos los principales sistemas, en orden de precisión creciente. Si trabajamos con un solo microscopio o con dos microscopios de la misma marca y del mismo modelo, podemos señalar las coordenadas de la platina con un barniz, pero en ocasiones estas coordenadas no siempre tienen el mismo origen cuando se cambia de modelo o de marca de microscopio.

Puede hacerse un dibujo a pequeño aumento o fotografiar el conjunto de la preparación o del objeto, señalando mediante puntos de color los detalles interesantes.

Puede señalarse lo que interesa con un punto de color o con una señal hecha con un diamante, al lado del material que interesará volver a encontrar.

Puede sustituirse la preparación por un microvisor de señalización, formado por casillas numeradas, una al lado de la otra. La ventaja de este sistema es la de permitir a dos microscopistas que dispongan del mismo tipo de microvisor comprenderse al escribir sobre una determinada cuestión.

Pero todos estos métodos carecen de interés si se tiene en cuenta el que describiremos a continuación, el más reciente en cuanto a su aparición, todavía poco conocido: se pega en el dorso del portaobjetos una delgada rejilla de plástico con cuadrículas numeradas. Para señalar se observa con un objetivo de pocos aumentos y desenfocando la preparación enfocamos la rejilla y se puede hacer la lectura de la cuadrícula que interese.

Tienen todas las ventajas: primero, que queda perfectamente adherida y por consiguiente está a nuestro alcance siempre que queramos, y por otro lado no dificulta en absoluto la observación de la preparación, dado que el plano de enfoque de las estructuras es distinto.

Sin embargo, debemos precisar que incluso las preparaciones denominadas permanentes, cuando se archivan verticalmente, con el tiempo y por acción de la gravedad pueden desplazarse ligeramente, dado que las resinas tardan en solidificarse, unas más que otras, y la parte central de la preparación tarda más en secarse.

LAS PLATINAS ESPECIALES Y SOBREPLATINAS

Para poder observar totalmente un objeto, una preparación, es imprescindible poder desplazarla de forma regular y cuantificada en las dos direcciones *x* e *y* del plano de la platina. Por el contrario, cuando se trata de seguir las evoluciones de un microorganismo vivo es preferible disponer de platinas con frotación grasa, que permita la motilidad en todos los sentidos, incluida la rotación y no únicamente tener que limitarnos a las dos coordenadas *x* e *y*.

La exploración sistemática, de cara al contaje principalmente, y en vistas al análisis cuantimétrico de las imágenes, ha provocado el diseño de platinas cuyos movimientos están coordinados por micromotores con avance continuo o bien con avance saltatorio: paso a paso. Incluso las platinas giratorias, utilizadas en polarización, en ocasiones han sido motorizadas.

Todas estas platinas tienen como máximo dos o tres grados de libertad. En las observaciones con luz polarizada puede interesar en un momento dado inclinar el objeto con respecto al eje óptico; para poder hacer esto, se coloca la preparación entre dos semiesferas de vidrio, a través de las cuales se observa la preparación con objetivos de gran distancia frontal, especialmente diseñados para este tipo de observación. Los movimientos se vasculan alrededor de dos ejes *x* e *y* con lo que tenemos dos grados más de libertad. Estas platinas reciben el nombre de «platinas teodolitas».

Las platinas o más bien las sobreplatinas calefactoras o refrigerantes son utilizadas en microquímica por depresión del punto de fusión o sublimación (fig. 77).

Algunas sobreplatinas permiten hacer el vacío alrededor del material a observar, mediante un bombardeo de partículas, a fin de fracturar la superficie, o bien para excitar determinadas fluorescencias. Se utilizan muy poco en biología.

En una sobreplatina puede disponer de un «microcompresor». Estos accesorios son incomparablemente útiles para disminuir el grosor del objeto, extender algunos de sus detalles, examinar su comportamiento al aplastarlo, etc.

La mayoría de los compresores son mecánicos. Sin embargo, preferimos el dispositivo de Bessis y Locquin, utilizando el hinchamiento de una delgada capa de un gel de gelosa o de gelatina para mantener el material contra la lámina del cubreobjetos. Con antelación de preparan cubre-

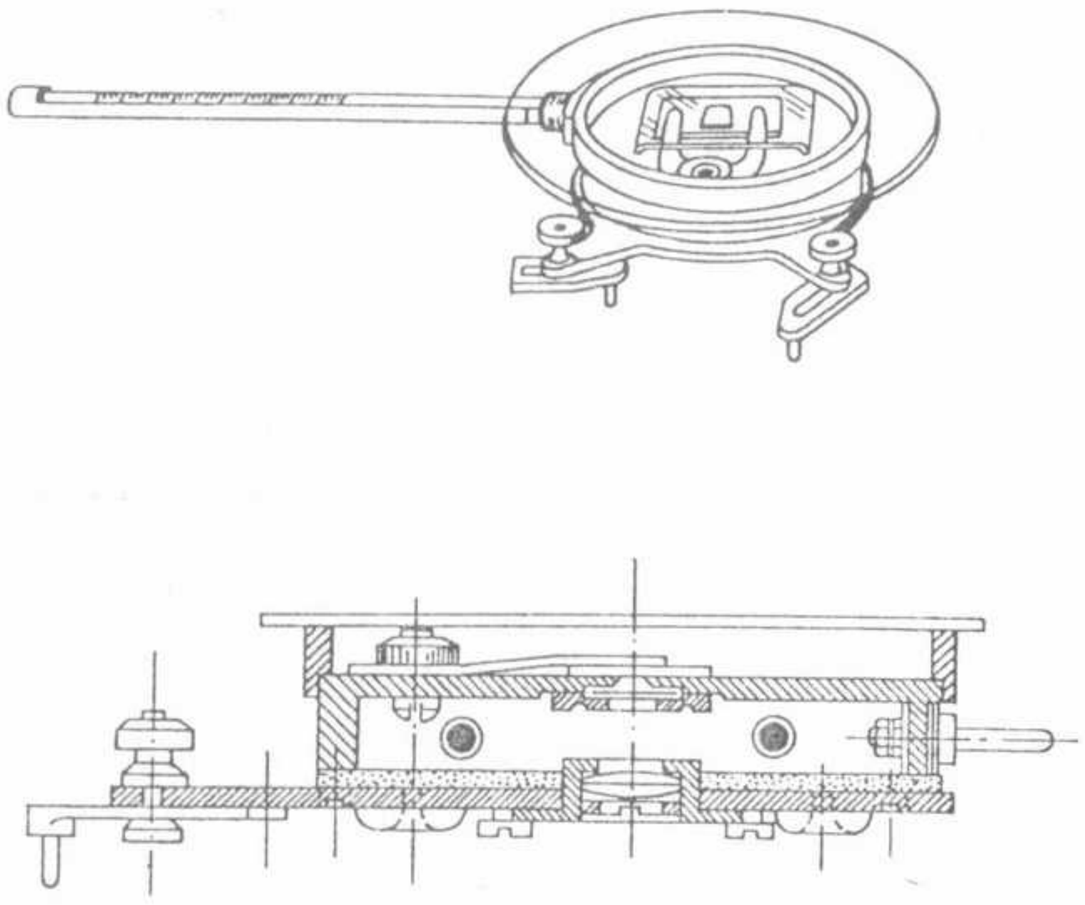


FIG. 77. — *Visión en perspectiva y en corte de una platina calefactora y refringente de Köfler.* Se incorpora un condensador en la cámara. El portaobjetos a observar se coloca en la cámara cerrada por su parte superior mediante un espejo plano; un fluido de temperatura previamente regulada circula en la cámara inferior; un termómetro incorporado indica la temperatura del sistema.

objetos que se sumergen en una solución de gelatina al 1 % o en gelosa y se dejan secar. Se deposita una suspensión en una microgota de agua y se recubre con un cubreobjetos. El agua es absorbida por el gel y los objetos se hallan comprimidos debido al hinchamiento del gel.

Para mejorar el funcionamiento de los compresores mecánicos clásicos es útil de colocar una pequeña lengüeta de vidrio bajo el cubreobjetos, según Bessis y Bricka, a fin de que por deformación los objetos sean comprimidos en el centro del campo de observación.

Los nonios son pequeñas reglas graduadas de unos 9 mm de longitud. Estos 9 mm están divididos en 10 partes iguales, cada una de las cuales corresponderá a 9/10 de milímetro: la diferencia entre las longitudes de una división milimétrica y de una división del nonio es pues de 1/10 de milímetro. Este artilugio permite evaluar las decenas de milímetro por la sencilla yuxtaposición de una escala milimetrada ordinaria que es la más próxima al 0 del nonio; dado que se siguen las divisiones del nonio, a partir del 0 hasta que una de ellas se encuentre coincidiendo con los trazos de la división milimetrada. Efectivamente, a causa del valor de la diferencia entre una división del nonio y una división milimetrada, los trazos 0, 1, 2 y 3, que preceden al que presenta una coincidencia, distan del trazo de la división milimétrica de 4/10, 3/10, 2/10 y 1/10 de milímetro. A continuación, el trazo 0, que precede en 4 divisiones al trazo 2, está distante de este trazo en 4/10 de milímetro. Es por ello que, mediante un nonio, podemos señalar un objeto, para posteriormente volverlo a localizar, en dos direcciones perpendiculares a 1/10 de milímetro.

EXAMEN MICROSCÓPICO BAJO ALTAS PRESIONES

Tal como ha demostrado Gavaudan y colabs., es posible trabajar al microscopio con objetos que estén sometidos a elevadas presiones. Por el hecho de que la lente frontal de los objetivos de gran aumento tengan muy poca superficie, pueden soportar presiones considerables, del orden de 1000 kg por cm^2. En un microscopio de estas características únicamente el objetivo forma parte integrada del recinto sometido a tal elevada presión. La observación de objetos vivos a altas presiones es posible gracias a este dispositivo.

LA AUTOMATIZACIÓN EN EL MICROSCOPIO

La automatización va siendo incorporada a la mayoría de las técnicas. En microscopia también se ha intentado aplicar, inicialmente a nivel de los accesorios del microscopio, antes de aplicarlo al propio microscopio. Evidentemente, resulta más fácil aplicar la automatización a los sistemas electromecánicos que a los sistemas ópticos. De esta manera, han sido el micrótomo, los sistemas de deshidratación, los de inclusión, los equipos de tinción y diferenciación de los primeros que han sido automatizados, total o parcialmente, sin demasiadas dificultades. Automatizar determinadas operaciones microscópicas, por el contrario, ha sido logrado recientemente y con frecuencia ha representado una inversión económica importante por la dificultad que conlleva. Citemos las que son estudiadas con mayor detalle en diversos capítulos de este manual:

— la automatización de las cámaras fotográficas, con determinación automática del tiempo de exposición y avance de la película una vez hecha la fotografía;

— el conseguir un sistema de iluminación constante, con corrección en función de la opacidad del objeto, realizado por M. Locquin en 1959;

— el dominio del enfoque del objetivo mecánicamente a nivel de la parte media del corte en 1968;

— el dominio óptico en el plano medio de la estructura de la imagen, independientemente de los desplazamientos del objeto, o incluso de su forma, realizado por un equilibrio entre una imagen nítida y una imagen borrosa debido a la aberración de esfericidad, siendo las dos globalmente captadas a través de una rejilla de anamorfosis, en 1969;

— el dominio del análisis de la imagen por un barrido, de la estructura misma de la imagen, o bien a nivel de discontinuidades, o a nivel de ho-

mogeneidades, efectuado con microscopios cuantimétricos;

— el dominio de la imagen a sus derivadas y a sus integrales, para poder realizar por vía electrónica modificadores de la imagen del tipo de: contraste de fases o contraste interferencial, con un abanico más grande de posibilidades, en 1970;

— el dominio de la iluminación a nivel constante por filtros fotosensibles;

— el dominio de la temperatura constante de observación de las preparaciones;

— el acoplamiento de un tubo de iluminación a nivel de la iluminación constante sobre la película.

Todas estas adaptaciones no han sido todavía realizadas industrialmente pero lo serán próximamente, a fin de que el coste de la realización no sea prohibitivo con respecto al coste de la operación por los sistemas convencionales. Recordemos que todos estos automatismos son mucho más fáciles de realizar sobre objetos del tipo de superficies metálicas planas, o con formas cristalinas más o menos geométricas, que sobre los objetos biológicos, de formas mucho menos regulares y con contrastes muy débiles.

Subrayemos, de memoria, los automatismos puramente mecánicos aplicados desde hace mucho tiempo al microscopio: el de la exploración lineal, o paso a paso, o en sinusoide de la imagen, por desplazamiento mecánico de la platina, coordinada por micromotores.

Algunos automatismos inherentes a los aparatos acoplados al microscopio pueden también citarse: así, la autorregulación de los vidicón o imagen orticón de las cámaras de televisión, el autorreglaje por sector de densidad óptica variable de la iluminación de la superficie sensible de las cámaras de cine.

Pero a pesar de todos estos datos estamos lejos de tener un microscopio automático, que examine automáticamente una después de otra las precauciones que le daríamos, para seleccionar estructuras predeterminadas, contándolas o fotografiándolas o llamando al microscopista para que las observe.

La combinación de los medios conocidos en la actualidad, puramente electrónicos, o electroópticos, o puramente fotométricos, con lo que se conoce como microscopia fotónica, en un futuro próximo permitirá esta realización automatizada del microscopio. Basta con evocar los métodos globales propuestos por Locquin en los «eccetrones» para estar seguros de ello.

MICROCIRUGÍA

Las microsondas

Con este nombre designamos todos aquellos dispositivos que permiten actuar de forma muy localizada sobre un determinado detalle de una estructura con vistas a una operación microquirúrgica.

La primera cagetoría de microsondas está formada por utensilios mecánicos extremadamente delgados que se usan generalmente a mano alzada, con un «decelerador» o con microdisecador o con un micromanipulador. Los principales utensilios en este caso son hechos para pinchar, agujerear, puncionar, seccionar, cauterizar, inyectar, excitar mecánica o eléctricamente, atar, etc.

La segunda categoría hace referencia a la corriente eléctrica para: cauterizar, cortar, hacer una microelectroforesis, una reoforesis, etc.

La tercera categoría utiliza únicamente los rayos lumínicos para efectuar determinadas operaciones: se trata habitualmente de hacer lesiones puntuales. Fue Tchakhotine el primero que lanzó la «micropuntura ultravioleta». La obtención del láser y la aplicación que de él hizo Bessis para la destrucción de orgánulos intracelulares fue un gran progreso. Tras los láseres con impulsión del rubí o del neodimio, se utilizan los láseres en el visible o en el infrarrojo. Los primeros son los

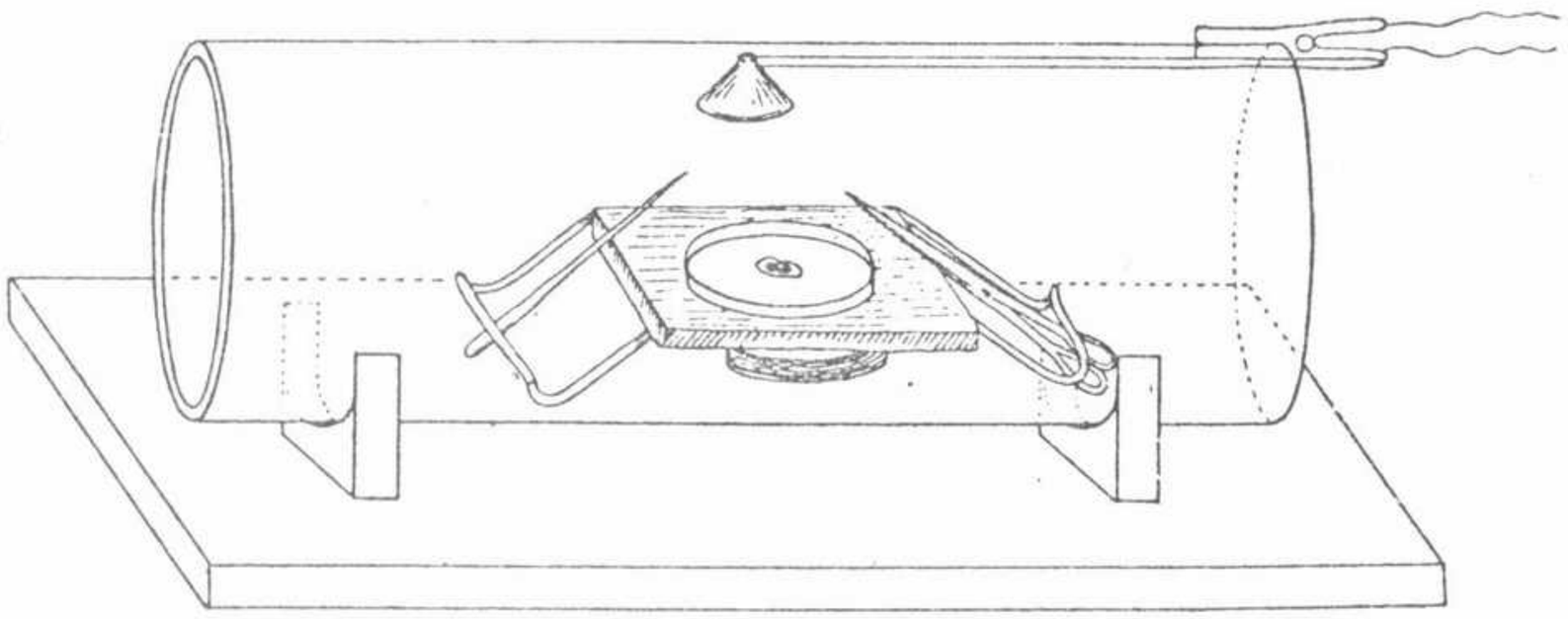


FIG. 78. — *Manguito de vidrio interiormente embadurnado con glicerina esterilizada para las manipulaciones delicadas en condiciones asépticas. El conjunto es esterilizado a la vez antes de su utilización en caliente.* Este dispositivo permite la utilización de un microscopio estereoscópico. Documento de Fonbrune.

preferidos en citología, los segundos en histología, dado que únicamente los láseres de tipo continuo pueden recortar un objeto de forma compleja. La intensidad de su radiación puede ser fácilmente dosificada y el tiempo de exposición puede ser más o menos largo. Durante mucho tiempo uno de los obstáculos más importantes para la utilización de los láseres en biología fue el de las escasas longitudes de onda disponibles, generalmente eran de larga longitud de onda: roja e infrarroja. La generalización de los láseres moleculares con colorantes ha levantado este obstáculo. Estamos seguros de que en un futuro próximo podremos disponer de todas las longitudes de onda del espectro visible.

Cada una de estas categorías de sondas es estudiada con los equipamientos especiales de los que forman parte: micromanipuladores, micropunteadores láseres, microscopios invertidos, microscopios de luz ultravioleta, etcétera.

Microsonda y microsoplete a láser

El alto grado de coherencia, la escasa divergencia y la gran cantidad de energía que puede presentar un haz de láser hacen de esta nueva fuente asociada a un microscopio en sentido inverso de la observación, un utensilio nuevo, que permita:

— si el láser es pulsado: una micropuntura, una microcoagulación, una microdestrucción, una microevaporación, una microperforación, etcétera.

— si el láser es continuo: un microcorte, una microcirugía, un microaislamiento, una microespectroscopia Raman, un microestudio basado en el efecto Tyndall, una microcoagulación, un microtrazado, una microholografía, una microactivación fotoquímica, el estudio de los fototropismas uni o intracelulares, etcétera.

La primera **microsonda** fue diseñada por Bessis (1961) para la destrucción de los orgánulos citoplasmáticos con un láser a rubí cuyo haz penetra en el ocular del microscopio para ser reducido por su óptico en un punto micrónico focalizado sobre el objeto. Un dispositivo auxiliar de visado permite, antes del impacto, una localización precisa de éste. Esta microsonda se aplicó enseguida, tras haber aumentado su potencia, para trabajar con metales o analizarlos espectográficamente. Los láseres sólidos más frecuentemente utilizados son: el rubí, el vidrio dopado a neodimio; los materiales desencadenadores (Q. Switch) son colorantes en medio líquido.

La **microforja** se basa en el mismo principio pero con un láser continuo: sea helio-neón, sea argón, sea YAG (itrio-aluminio-Garnet), bien sea orgánico en medio líquido. Únicamente este último láser permite hacer variar la longitud de onda de utilización de forma continua. En biología es una especie de «microacupuntura» análoga a la que había puesto a punto Tschakhotine con un haz de rayos U.V. Pero el láser es mucho más versátil, más delicado, con mayores posibilidades. Entre las aplicaciones dadas más arriba, una de las que merecen una atención especial es la holografía, inventada por D. Gabor (1948) en microscopia, mucho antes que se inventara el láser. Su aplicación a la imagen microscópica no ha sido probada a gran escala y por ello su porvenir está lleno de promesas.

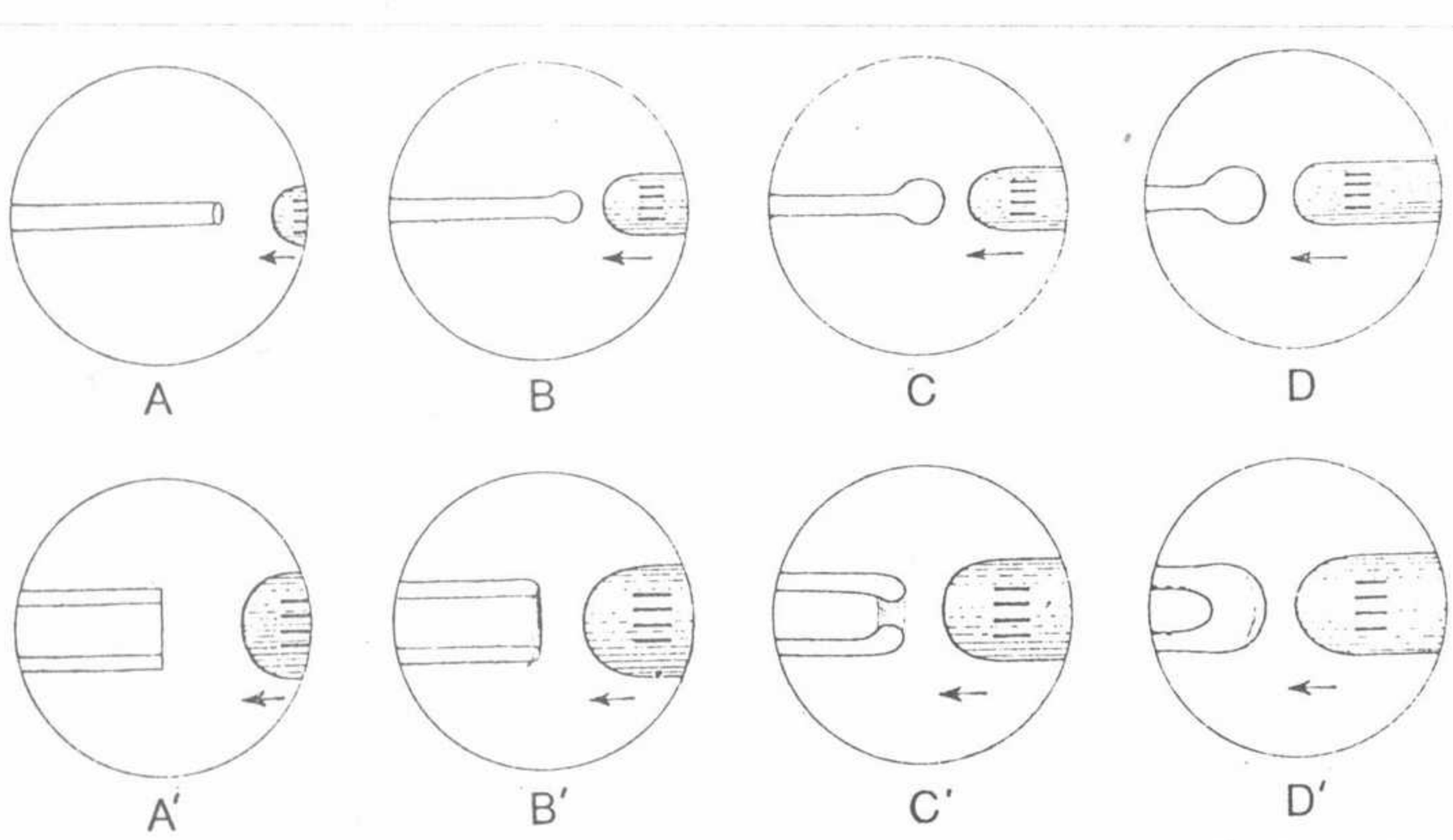


FIG. 79. — *Microesfera y hemisferio en forma de tubo.* A la derecha, el filamento calentador observado con el ocular de la microforja de Fonbrune, como en las restantes figuras, hasta la figura 91. Documentos de Fonbrune.

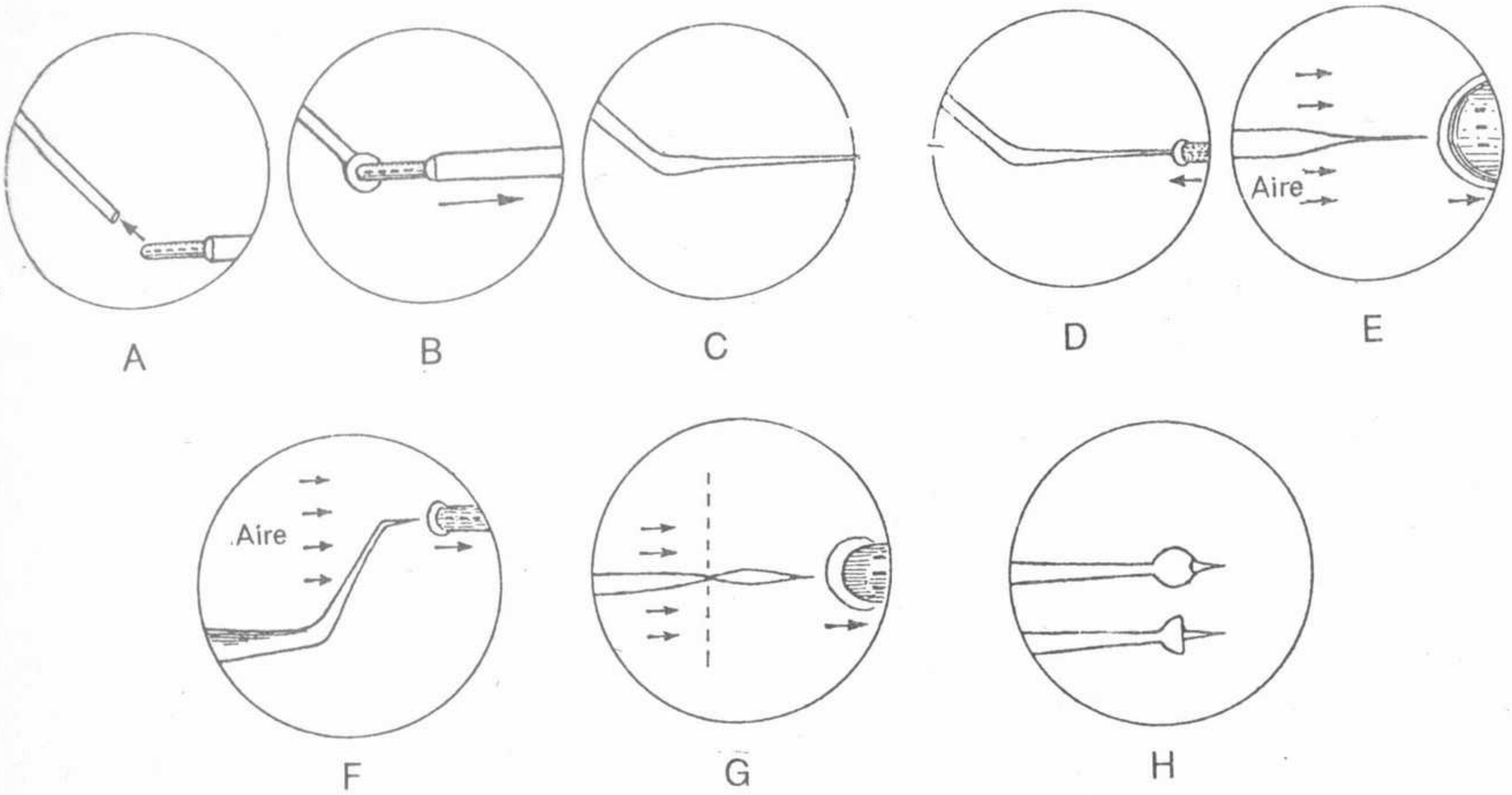


FIG. 80. — *Microagujas.* En la parte superior: alargamiento; abajo, tres formas distintas.

Micromanipulación y microdisección

Se reserva la denominación de «micromanipulador» a los instrumentos que permiten trabajar a aumentos medianos y grandes con un microscopio monoobjetivo y «microdisectador» con instrumentos especialmente concebidos para trabajar a pocos aumentos, desde microscopios estereoscópicos a lupas binoculares.

Al tener que escoger un micromanipulador se debe tener muy presente qué finalidad se persigue, qué tipo de trabajo se pretende hacer. Será más fácil mantener el material fijo con un instrumento con mandos *x, y, z,* mecánicamente independientes; por el contrario, una intervención microquirúrgica se hará mucho mejor con un mando único el tipo «palanca de mando» como las que existen en los aparatos diseñados por Fonbrune o Monchablon. Un cambio en las demultiplicaciones es necesario cuando se cambia de aumentos. Una inversión de mandos es necesaria cuando se pasa de un microscopio con imagen derecha (estereomicroscopio) a un microscopio de imagen invertida (monoobjetivo).

La micromanipulación se aprende con la práctica y con mucha paciencia. Por el contrario, la fabricación previa de los microinstrumentos puede difícilmente estandarizarse pero no automatizarse. Encontramos aparatos que hacen automáticamente micropipetas, microagujas o microjeringas. El instrumento ideal y completo es la microforja de Fonbrune. Para diseñar los instrumentos se dispone de todos los grados de libertad y de un soplete regulable para enfriar, incluso en el transcurso de la operación. Explicaremos mediante imágenes la fabricación de diversos utensilios útiles con la microforja de Fonbrune.

Forja de utensilios

Ilustraremos sucesivamente las siguientes fabricaciones:

Microesfera calibrada - Estirado de microagujas - Curvatura por fusión desigual - Alargamiento de las micropipetas - Microescalpelo - Cubreobjetos de bordes curvados.

Una colección de estos utensilios es indispensable para cualquier tipo de trabajo propuesto.

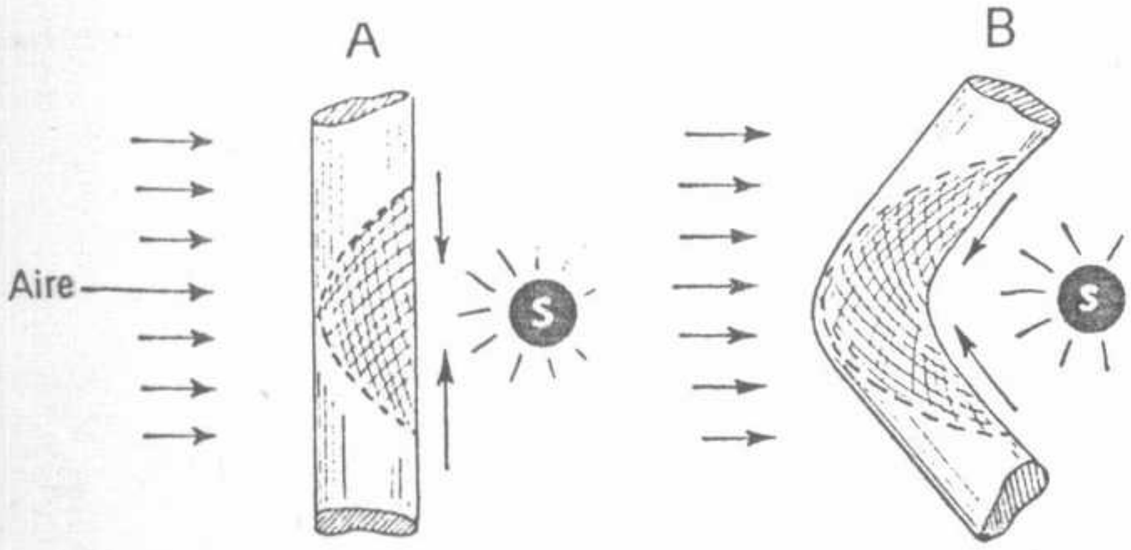


FIG. 81. — *Inicio de la curvatura de una varilla de vidrio por fusión desigual.*

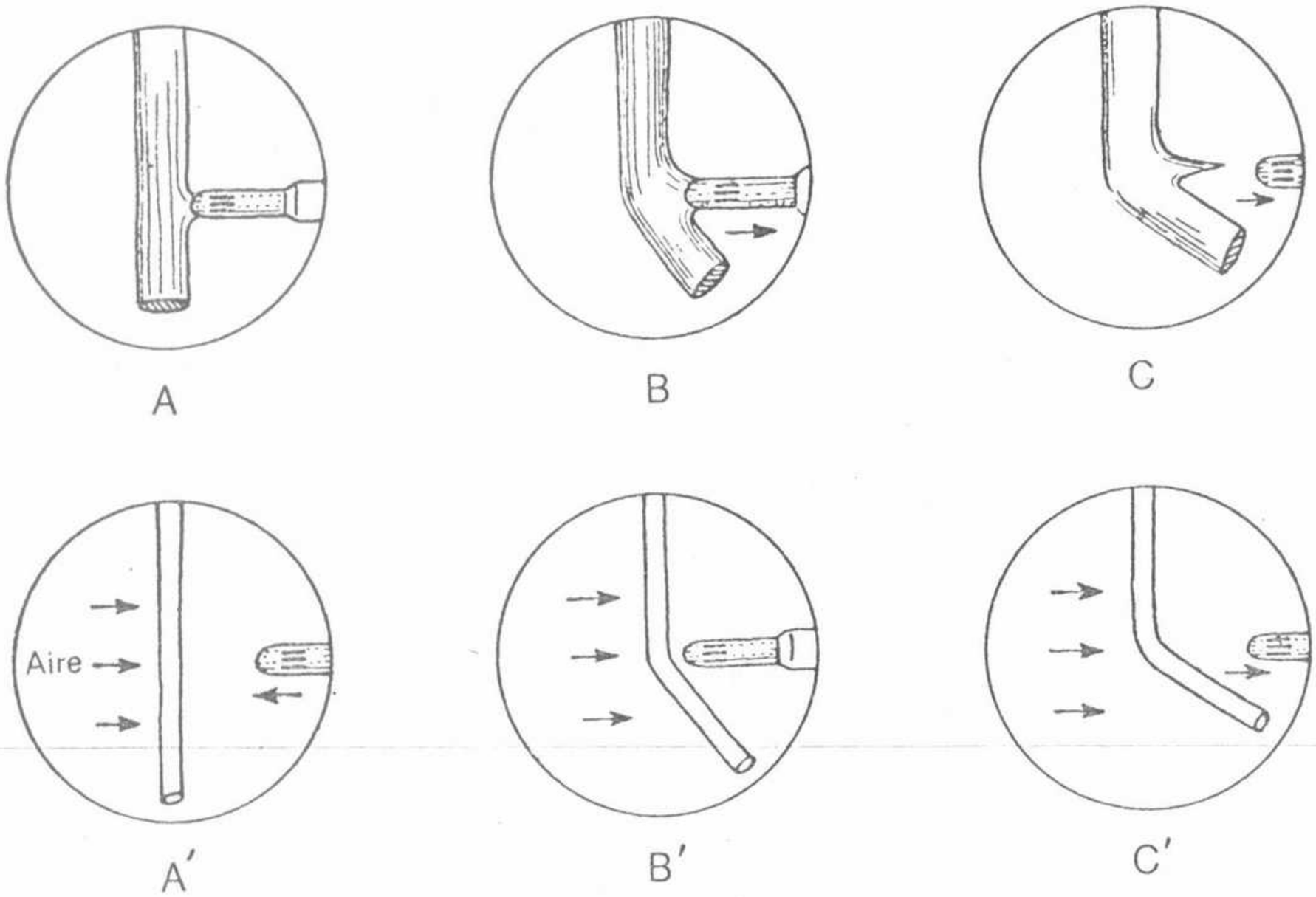


FIG. 82. — *Curvatura por desigualdad de fusión de una varilla de vidrio, gruesa en la parte superior, delgada en la inferior.*

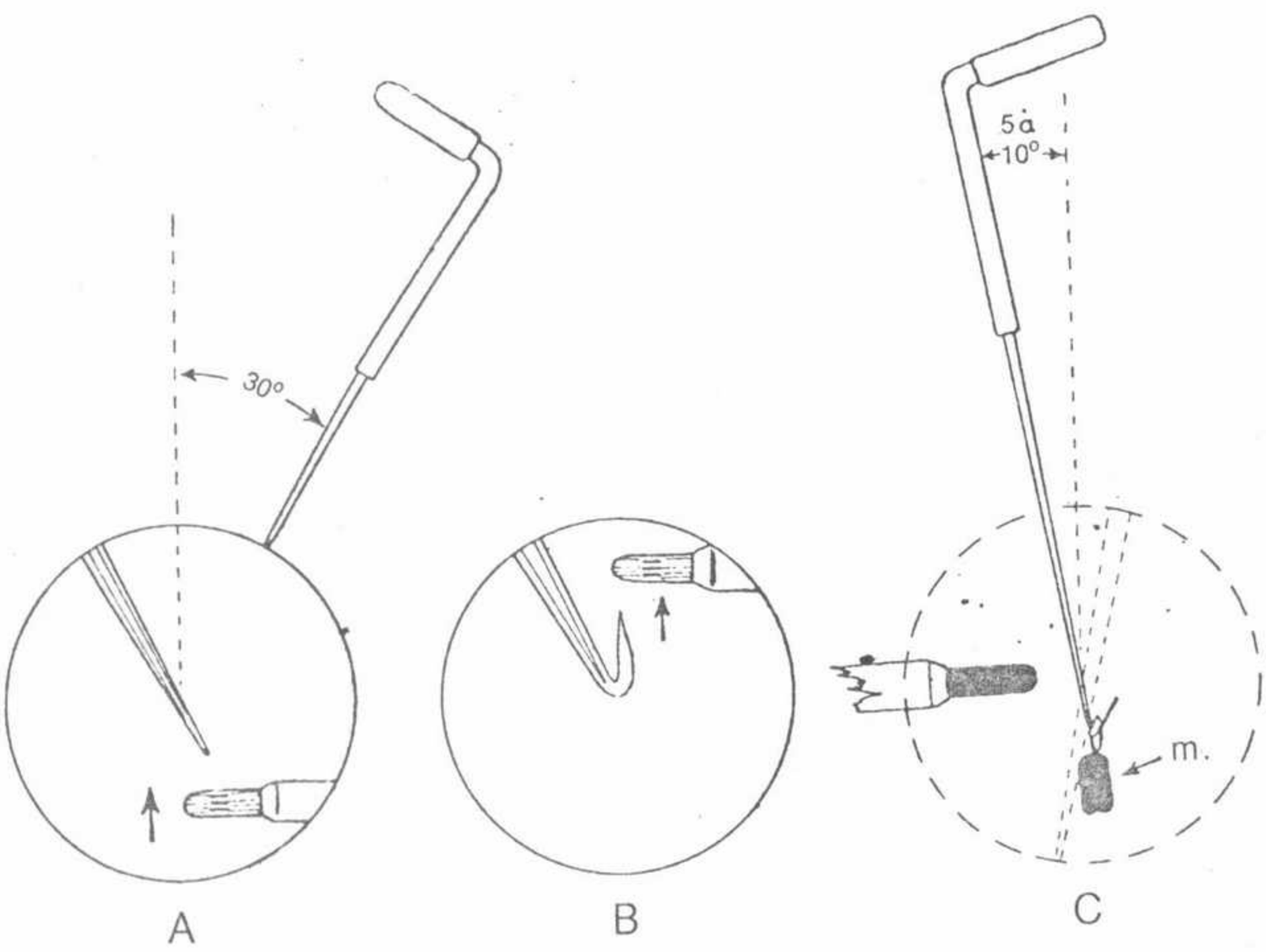


FIG. 83. — *Fabricación de un asa por elongación de una micropipeta.*

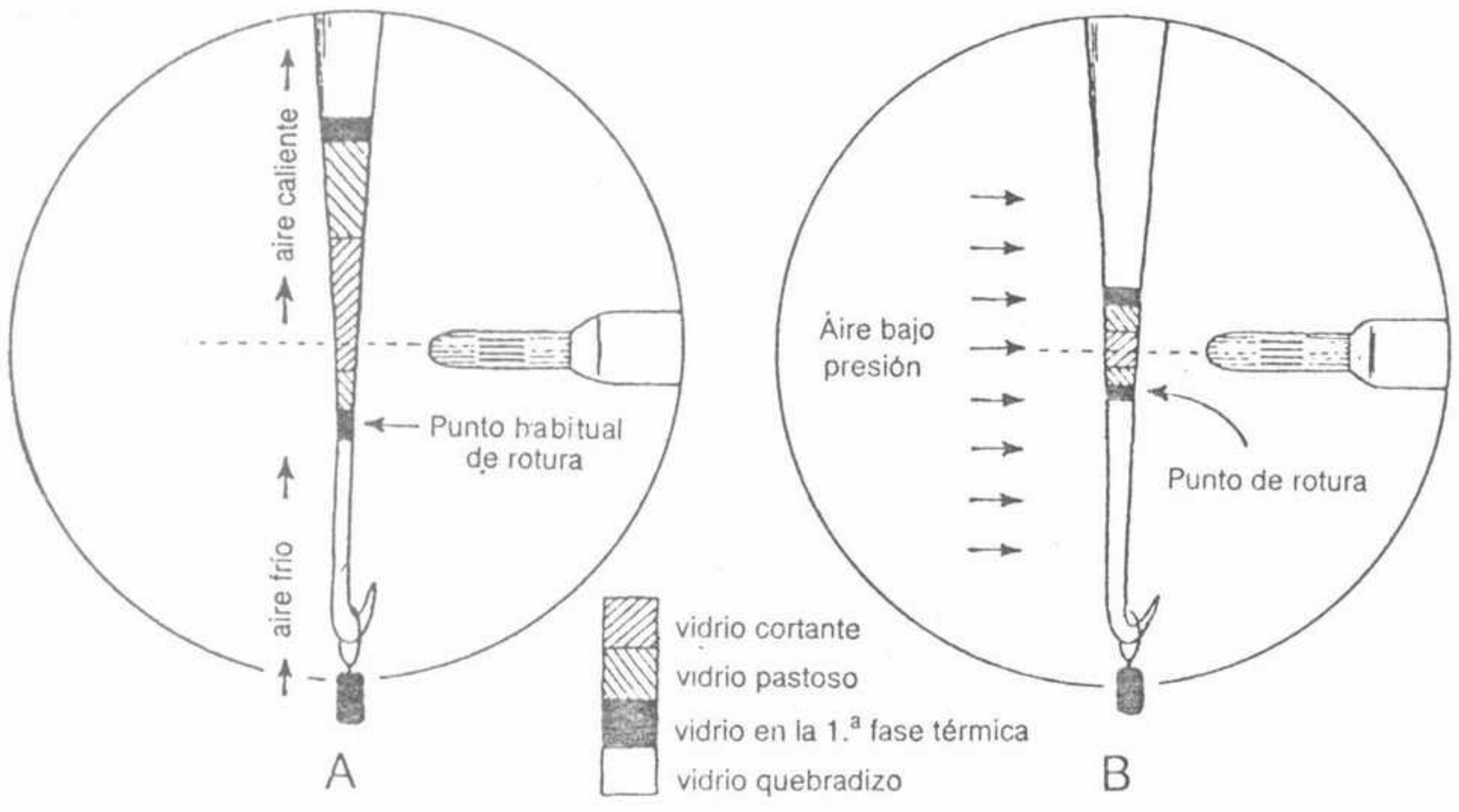


FIG. 84. — *Rotura de un hilo calentado a distancia, a la izquierda, no enfriado; a la derecha, enfriado por el aire.*

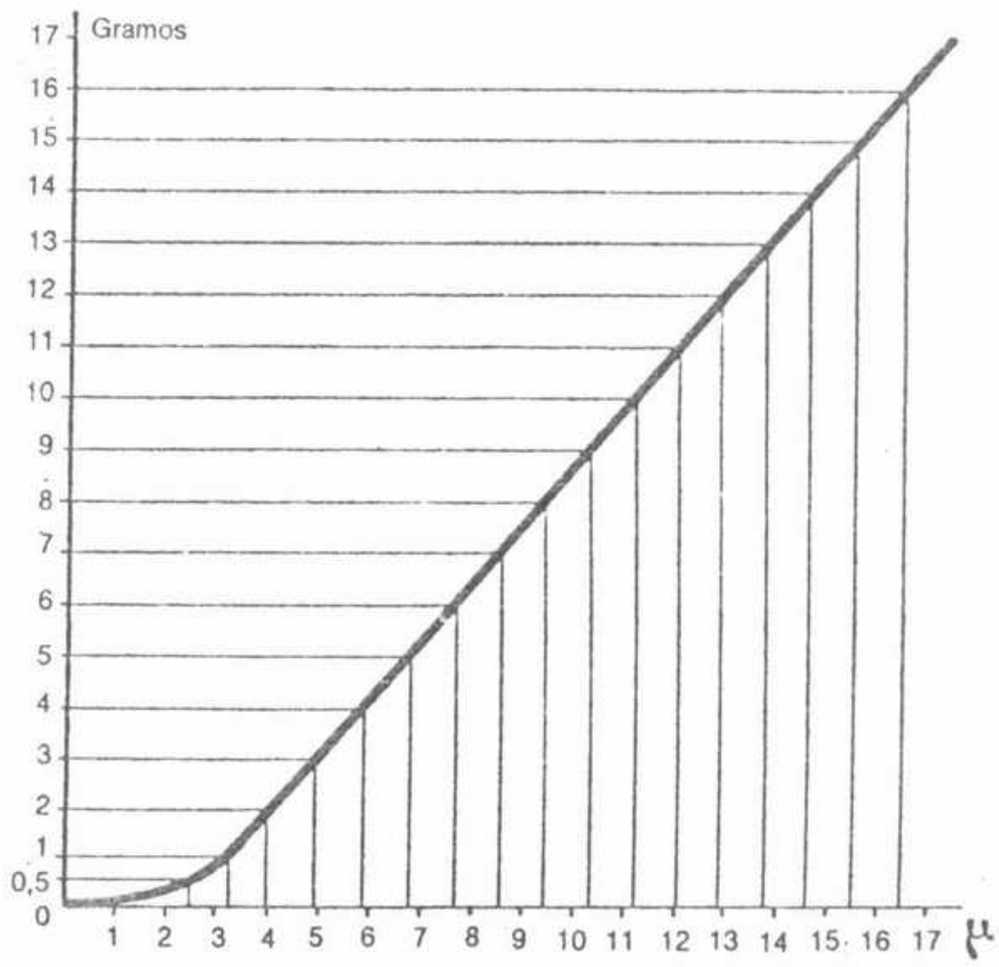


FIG. 85. — *Diámetro de las micropipetas alargadas a la misma temperatura en función del peso de tracción según Fonbrune.*

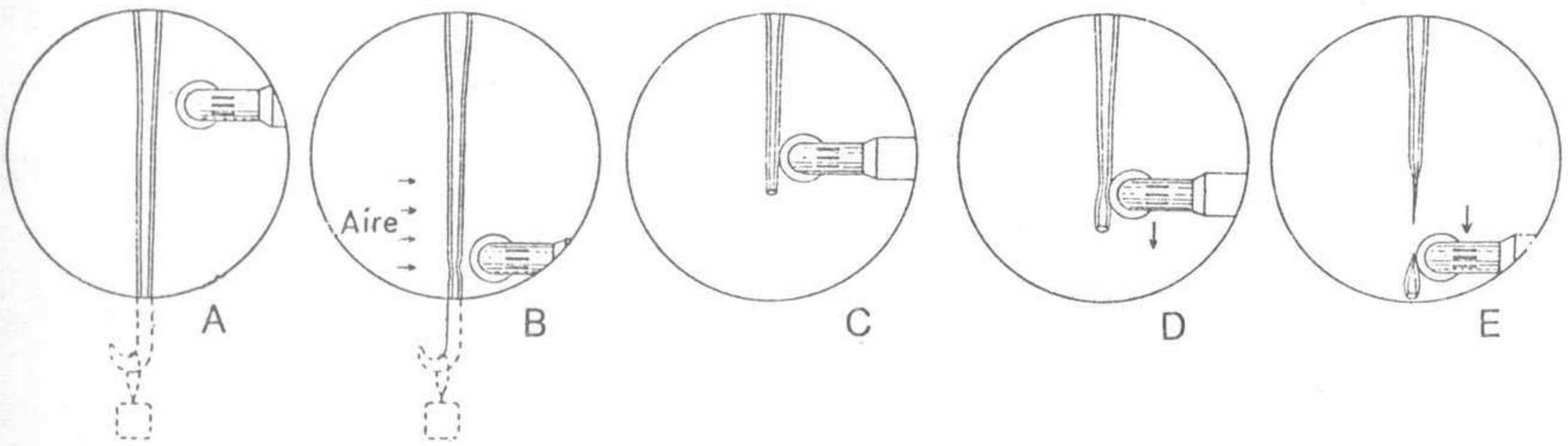


FIG. 86. — *Alargamiento de micropipetas ultrafinas de menos de 1 micra.*

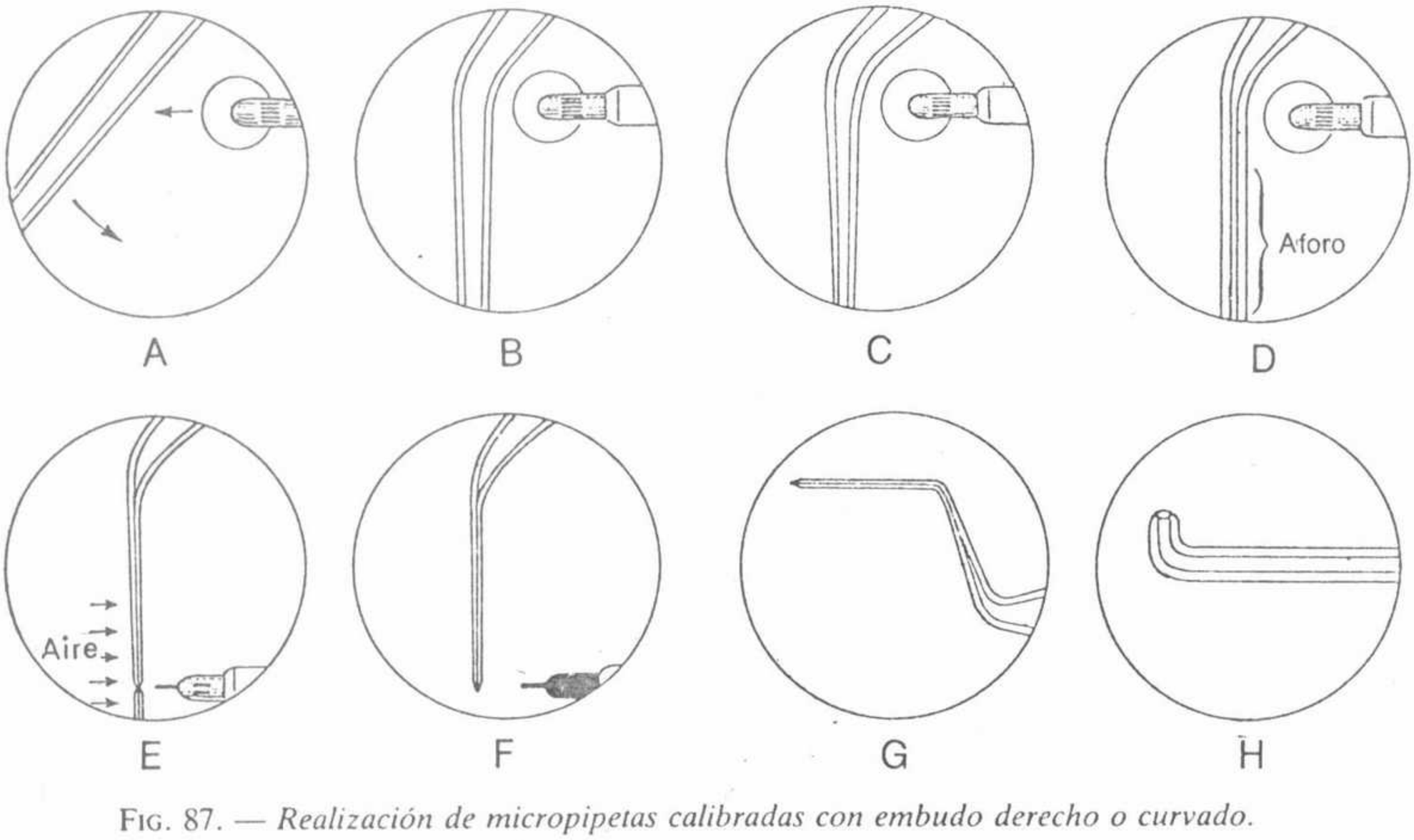


FIG. 87. — *Realización de micropipetas calibradas con embudo derecho o curvado.*

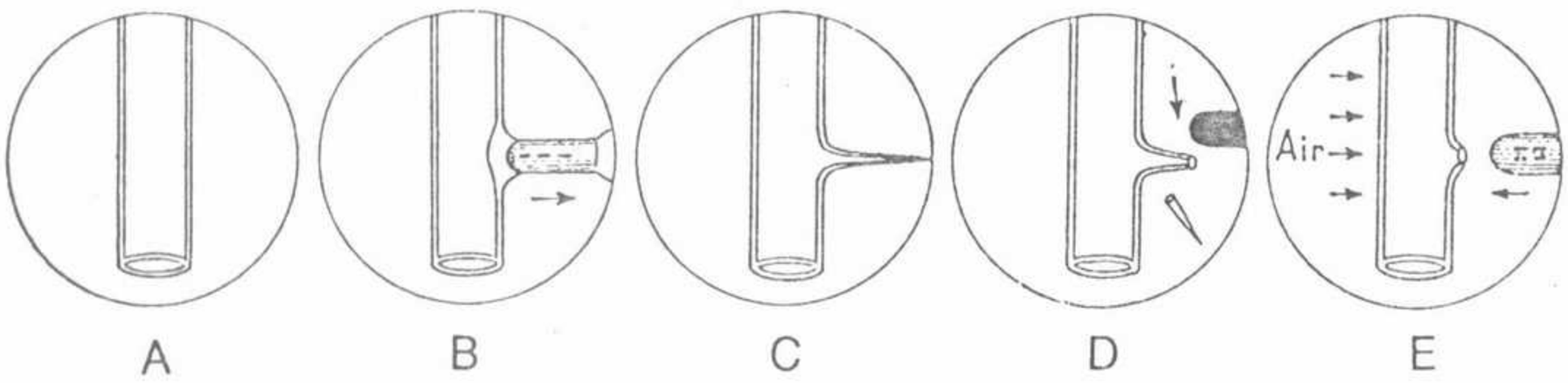


FIG. 88. — *Construcción de un orificio lateral en una pared de vidrio.*

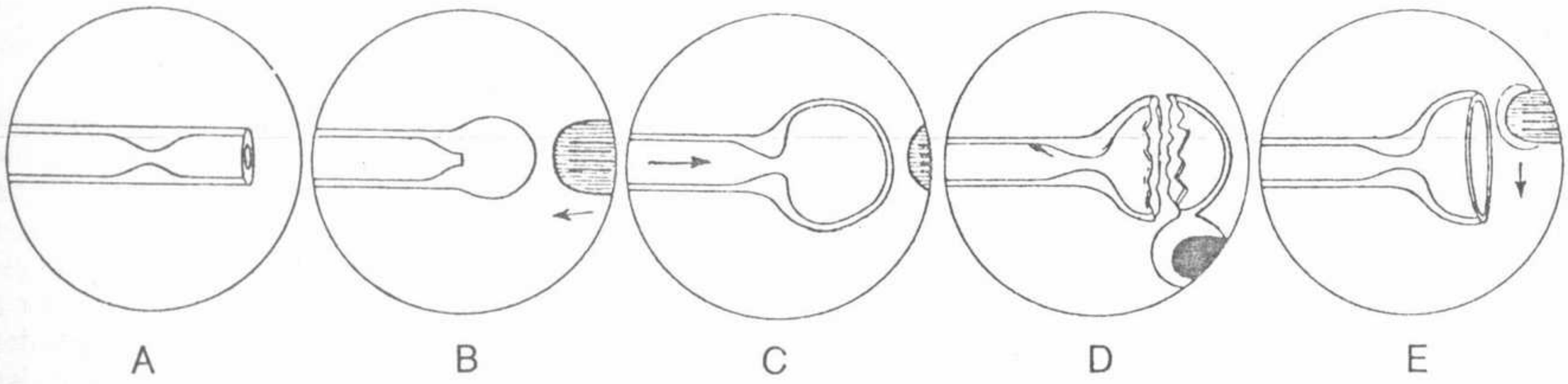


FIG. 89. — *Fabricación de una ventosa de contención con vidrio soplado.*

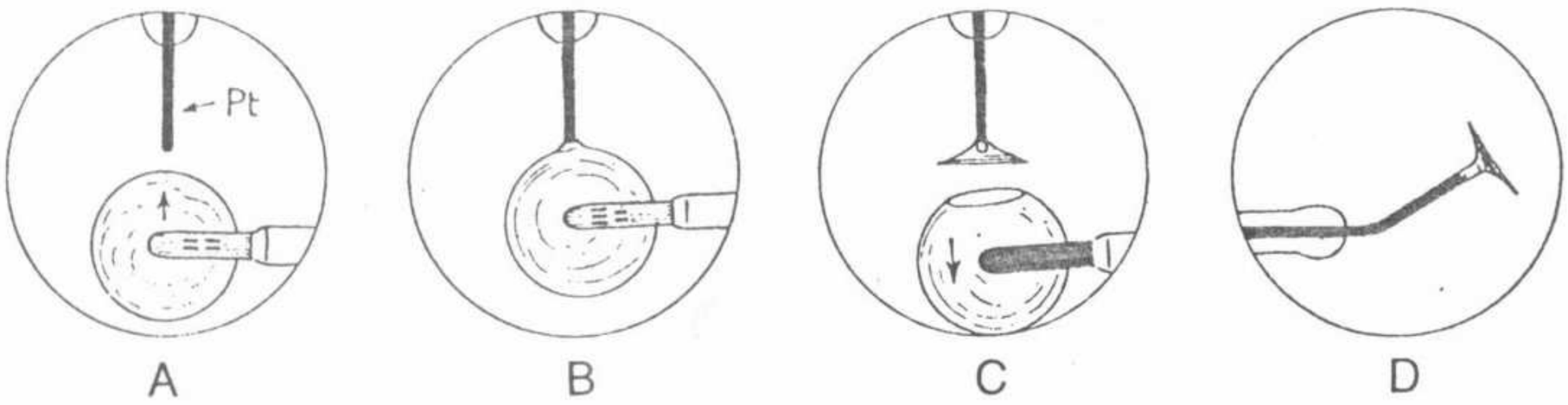


FIG. 90. — *Método de Schouten para la fabricación de un microescalpelo en vidrio.*

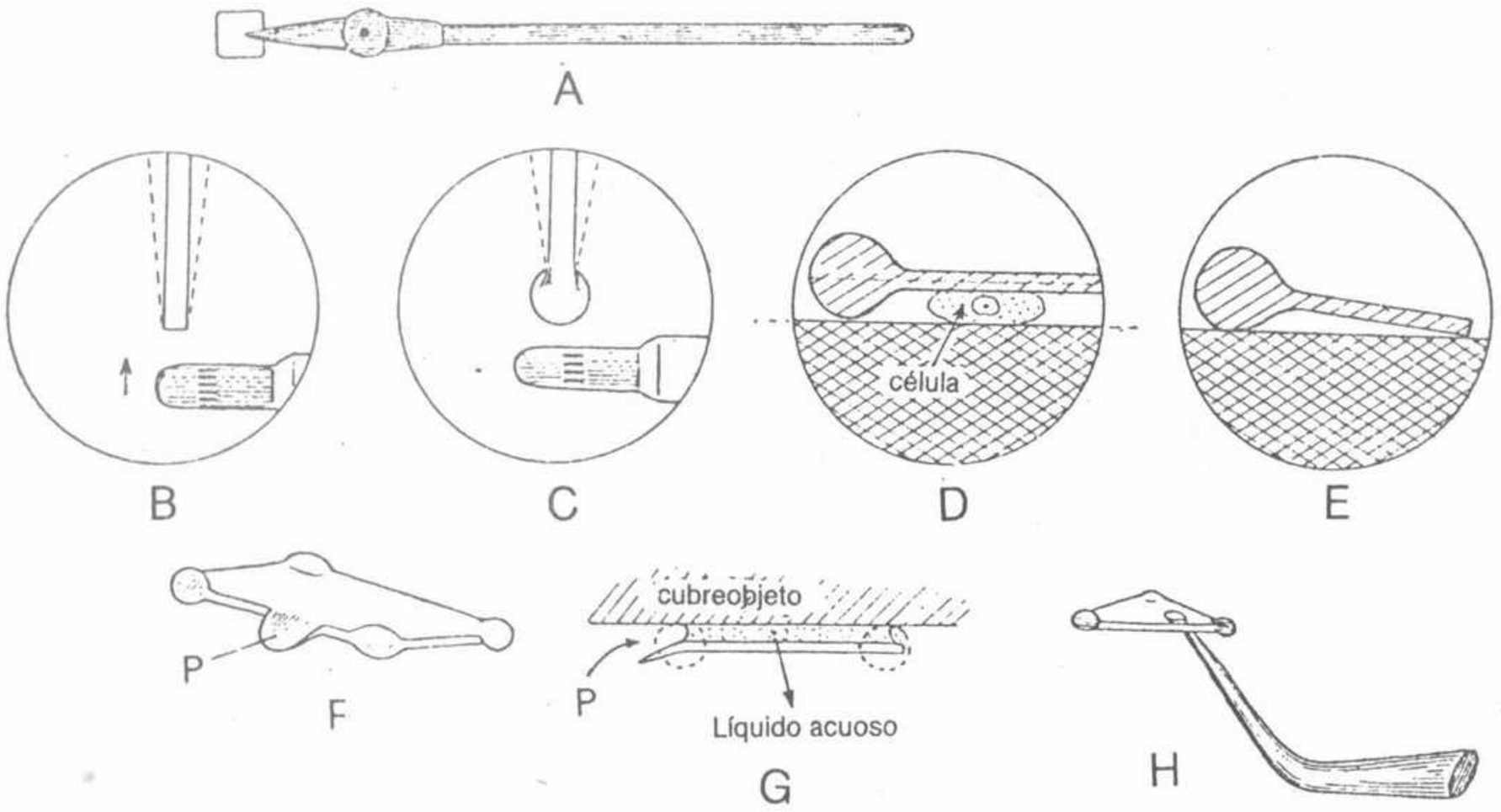


FIG. 91. — *Elaboración de un cubreobjetos para no aplastar los microorganismos.* Obsérvese que en las imágenes de la 79 a la 91 todas las operaciones han sido esquematizadas observadas a través del ocular de la microforja de Fonbrune. Documento de Fonbrune.

VIII. — UTILIZACIÓN DE LA LUZ MONOCROMÁTICA

LOS MONOCROMATORES

Se trata de dispositivos ópticos que permiten variar de forma continua la longitud de onda de un haz luminoso en la zona visible del espectro, así como en el U.V. o en las proximidades del I.R.

En microscopia, los únicos monocromatores prácticos son aquellos que dan un haz geométrico fijo en el espacio, aunque de longitud de onda variable. Hay cuatro categorías de dispositivos de esta índole:

— Los filtros dispersivos de Christiansen: la variación de longitud de onda se debe a variaciones de temperatura.

— Los filtros polarizadores de Lyot, perfectos aunque muy costosos.

— Los monocromatores catadióptricos (figura 92).

— Los monocromatores interferenciales con patrón, de Fabry-Perrot en cuña.

Únicamente los dos últimos son los de utilización más práctica en microscopia. Cada vez que se desea una localización de una determinada longitud de onda se utilizarán los monocromatores catadióptricos; cada vez que predomine una débil acumulación se escogerán los monocromatores interferenciales. En este último caso, montando pies en cabeza, dos filtros del mismo tipo permitirán aumentar la precisión de la banda escogida, dejándola fija en el espacio.

Un filtro interferencial monocromático es, hasta cierto punto, un monocromator, dado que permite una pequeña variación de la longitud de onda de la banda seleccionada, en función del ángulo de incidencia del haz. Para ello, debe montarse sobre una montura de rotación, con graduaciones.

LOS ESPECTRÓGRAFOS

Durante mucho tiempo se ha preferido analizar la luz tras haber atravesado el objeto, más que iluminar el objeto con luz monocromática variable. Se utilizaban monocromatores situados después del microscopio; la imagen del objeto se proyecta sobre la hendidura de entrada del espectrógrafo. Espectrógrafos oculares minúsculos sustituyen al ocular normal y han sido comercializados. Pero estos dispositivos han sido prácticamente abandonados por la siguiente razón: la estructuración de la imagen del objeto viene a mezclarse con las bandas del espejo. Los espectroscopios oculares son, por el contrario, fabulosos para poder escoger filtros de color, diferenciar las bandas presentes en un espectro y analizar rudimentariamente con luz fluorescente.

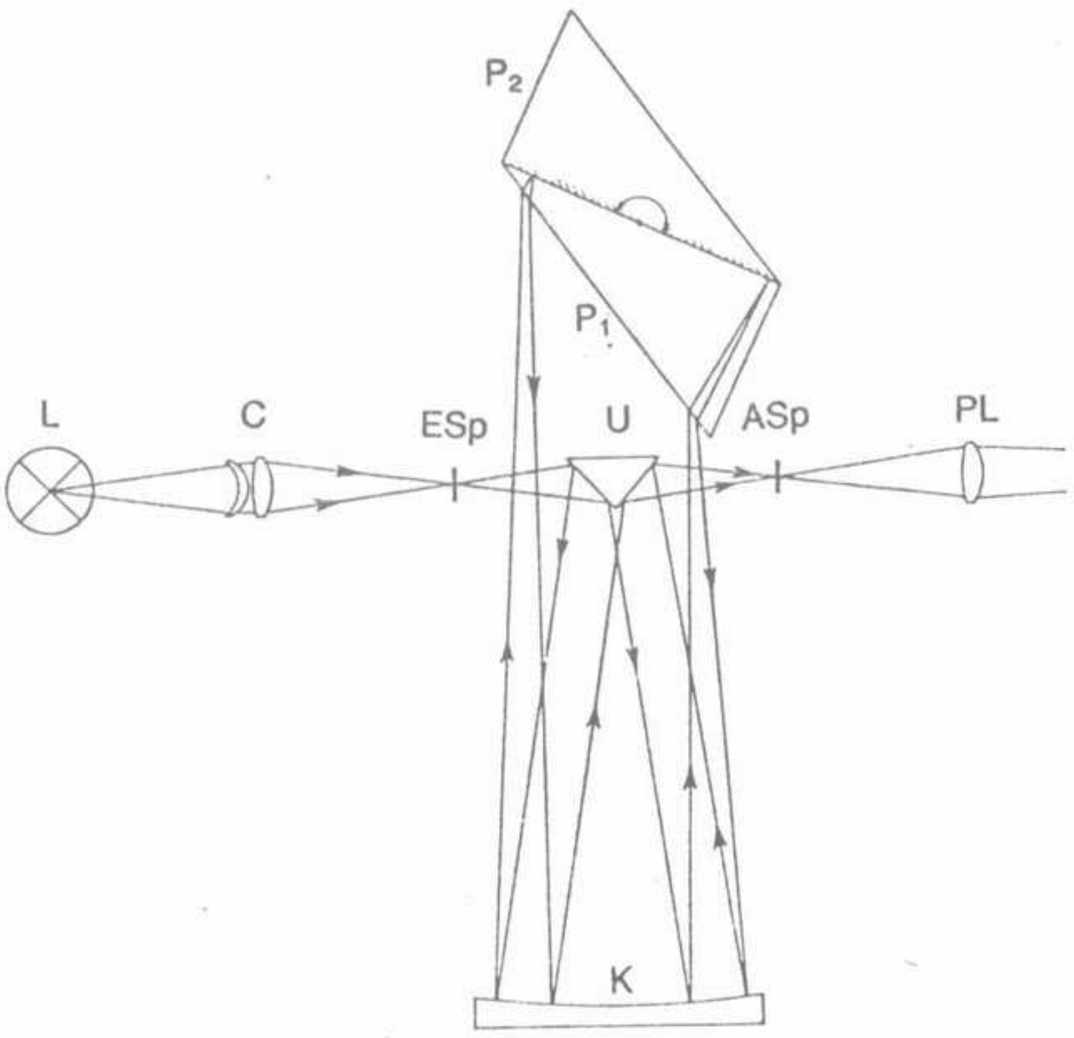


FIG. 92. — *Monocromatizador de trayectoria directa.* Documento de Leitz-Wetzlar.

MICROESPECTROGRAFÍA A DESTELLO Y ESPECTROGRAFÍA DE EMISIÓN

En principio, en estos aparatos, un destello a elevada temperatura llega a un determinado punto del objeto observado al microscopio y la luz emitida, tras su paso por el microscopio, entra en un espectrógrafo para ser analizado. Los destellos pueden ser producidos por una corriente eléctrica o por un láser a impulsos. Este segundo tipo de excitación, mucho más preciso, es muy superior al primero. Necesita menos materia y menos tiempo. El láser es generalmente de barra sólida con un dispositivo pasivo de disparo (Q. Switch) que aumenta la potencia de la cresta. Dado que la energía del láser es casi enteramente utilizada para vaporizar la pequeña cantidad de sustancia analizada, es necesario de incorporar al equipo un disparador auxiliar, que elevará la temperatura del gas producido para ionizarlo suficientemente a fin de que las bandas características sean bastante intensas.

El microscopio debe estar dotado de una óptica con espejos o de cuarzo para poder trabajar con luz ultravioleta.

Este microespectrógrafo es utilizado para el análisis de los constituyentes elementales intracelulares e intratisulares, salvo el carbono y los átomos muy ligeros, así como los que están normalmente presentes en el aire. Los elementos más fáciles de detectar son: Ag, Au, Al, As, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Pt, Sb, Si, Sn, Sr, Tl, Zn, Ti.

La aparición de los microscopios electrónicos de barrido con analizadores incorporados ha disminuido considerablemente el interés de los microespectrógrafos. Remítase al capítulo XI para mayores detalles sobre las ventajas de estos nuevos métodos, que tienen como inconveniente la necesidad de trabajar con objetos deshidratados y en un vacío elevado.

LOS MICROFOTÓMETROS Y MICROESPECTROFOTÓMETROS

Se trata de microscopios provistos de un fotosensor extremadamente sensible y fiel para medir la luz, punto por punto en el objeto. Cuando el aparato está conectado con una unidad de tratamiento de la información se transforma en un microscopio cuantimétrico estudiado en las páginas 95 y 96.

Una medida microfotométrica permite determinar sobre un objeto los siguientes factores: densidad óptica por transmisión, grado de extinción en polarización, grado de contraste en contraste interferencial, poder reflector de un objeto, intensidad de la difusión, de la remisión (reflexión difusa), de la fluorescencia, del efecto Tyndall, etc.

Cuando el instrumento está acoplado a un monocromator de variación continua de la longitud de onda, se convierte en un microespectrofotómetro.

Medida de la densidad óptica. — La densidad óptica es en todos los casos la variable fotométrica medida, bien sea porque el propio objeto presenta una banda de absorción selectiva, o por estar artificialmente teñido por un colorante específico, o por el hecho de que el método de producción de la imagen esté fotométricamente unido a las características del objeto.

Para ello, el microscopio está equipado por un fotomultiplicador, colocado detrás del diafragma selector del aparato de medición. Un dispositivo de iluminación auxiliar permite visualizar este diafragma superpuesto a la imagen del objeto para seleccionar sobre el objeto, el sitio a medir a la vez que su diámetro (fig. 93). Generalmente, tras el diafragma de medición puede introducirse un filtro interferencial u otro para limitar la banda espectral de medición. Cuando el aparato está equipado para hacer mediciones con ultravioleta, el fotomultiplicador posee una ventana de cuarzo.

El fotomultiplicador es una célula fotosensible equipada interiormente por una serie de electrodos multiplicadores de los electrones arrancados por el impacto de los fotones sobre el fotocátodo. La alimentación debe ser estable, tanto a nivel de la fuente de iluminación del microscopio, como del fotomultiplicador. Todos los fotomultiplicadores que tienen un «ruido de fondo», o corriente de oscuridad, no deben utilizarse a niveles de ilu-

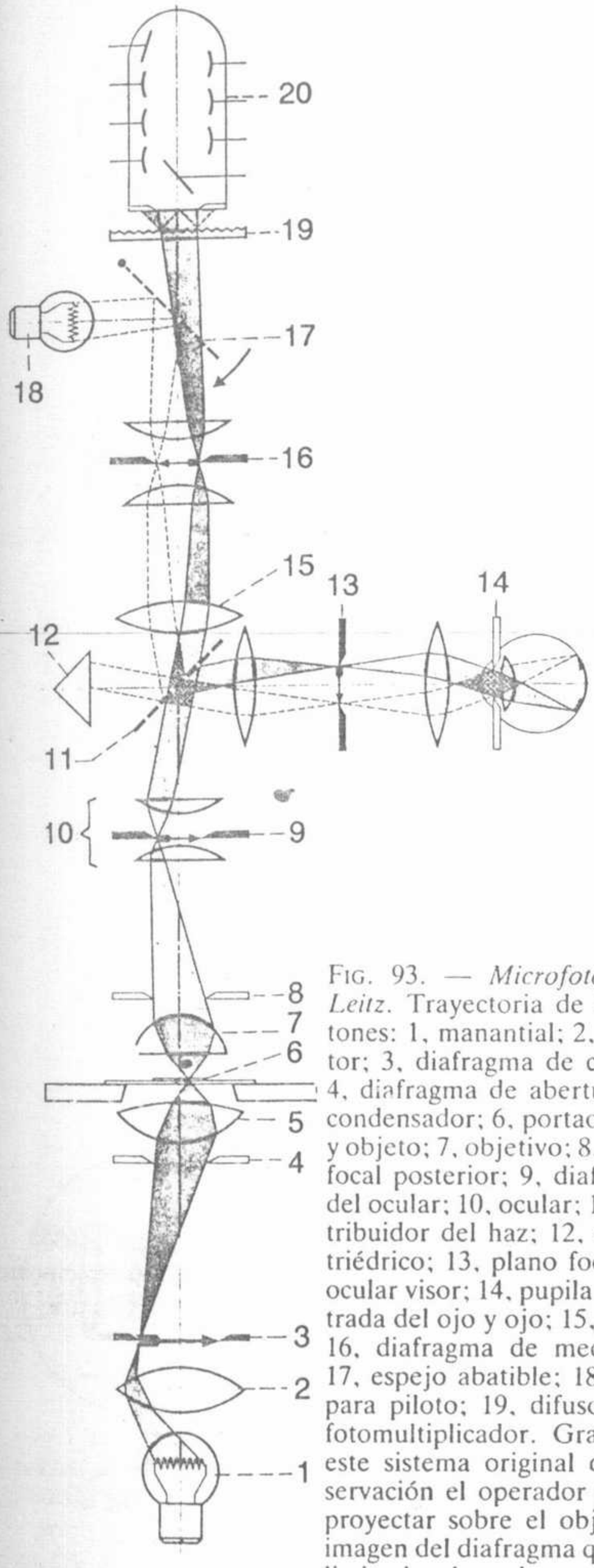


FIG. 93. — *Microfotómetro Leitz*. Trayectoria de los fotones: 1, manantial; 2, colector; 3, diafragma de campo; 4, diafragma de abertura; 5, condensador; 6, portaobjetos y objeto; 7, objetivo; 8, plano focal posterior; 9, diafragma del ocular; 10, ocular; 11, distribuidor del haz; 12, espejo triédrico; 13, plano focal del ocular visor; 14, pupila de entrada del ojo y ojo; 15, lente; 16, diafragma de medición; 17, espejo abatible; 18, lámpara piloto; 19, difusor; 20, fotomultiplicador. Gracias a este sistema original de observación el operador puede proyectar sobre el objeto la imagen del diafragma que delimita la placa de medición, antes de efectuar la medida. Documento Leitz-Wetzlar.

minación muy bajo, sin tomar previamente una serie de precauciones. Dada la gran sensibilidad de estos equipos es aconsejable trabajar con una iluminación ambiental atenuada para evitar la entrada de luz parásita.

Podemos incrementar la precisión de las medidas mediante un modulador electro-óptico como en el «velomet» de Jena: El modulador posee una lámina de penumbra especial que se somete a vibraciones. Estas vibraciones modifican el estado de interferencia del sitio que debe medirse. La transformación en una señal eléctrica está asegurada por el fotomultiplicador. Tras el tratamiento correspondiente en una unidad electrónica, la señal es dada al instrumento por la posición central de la aguja.

Medida de las longitudes de onda. — Hemos visto que la incorporación de un monocromator transforma un microfotómetro en microespectrofotómetro. Este monocromator, en el caso de ser un filtro tipo cuña interferencial, está generalmente localizado detrás del diafragma selector del campo a medir; si es a base de prismas en red, generalmente se coloca entre la fuente lumínica y el objeto. En este último caso se utiliza la iluminación crítica proyectando la imagen de la hendidura de salida del monocromator sobre el objeto, con la ayuda del concentrador.

Algunos aparatos poseen diversos grados de automatización: registro de la curva de absorción espectral con paso continuo del espectro o corte fotométrico a través del objeto a longitud de onda fija. En este último caso estamos frente a un «Tomofotómetro» (Locquin).

En todos los casos es aconsejable registrar fotográficamente la imagen del objeto con el diafragma de selección.

En microscopia de fluorescencia, si el aparato tiene buenos filtros, nos limitamos generalmente a hacer una medición global de la luz èmitida; sin embargo, en el caso de que varios constituyentes estén simultáneamente presentes en la misma estructura, puede ser interesante y útil proceder a una selección complementaria de las longitudes de onda con la ayuda de filtros interferenciales monocromáticos.

Cuando estos aparatos están asociados a unidades de tratamiento de la información se denominan «microscopios cuantimétricos» o microcuantimétricos.

IX. — MICROANÁLISIS ESTEREOLÓGICO

NUMERACIÓN

Para apreciar la cantidad exacta de elementos en suspensión que hay en un líquido biológico, sea del tipo que fuere, es preciso proceder a una conveniente dilución, a fin de que los elementos estén suficientemente separados entre sí para poder contabilizarlos sin riesgo de errores. El líquido de dilución puede tener otras funciones: conservación, tinción, lisis de determinados elementos, de forma específica. Para efectuar el contaje, tras dilución, se coloca la suspensión de una pipeta graduada especializada, en una cámara de numeración, es decir en una célula calibrada, cuyo fondo es cuadriculado. Estas cámaras reciben distintas denominaciones, según el tipo de cuadrícula que lleven: Malassez, Thoma, Bürker, Neubauer, etc. La elección depende de las preferencias de cada usuario, los resultados obtenidos son equivalentes. Debemos asegurarnos en todos los casos que el cubreobjetos que cierra la cámara de contaje esté bien colocado sobre su soporte, de lo contrario tendríamos la posibilidad de cometer graves errores.

Los errores pueden ser motivados por una mala extensión de las diluciones o por la profundidad de las células, por el hecho de que el cubreobjetos no sea totalmente plano, a un lavado incompleto, a haber hecho una extracción incorrecta, a su falta de homogeneidad, a aglutinaciones parciales normales o patológicas, al cansancio del operador, a las inseguridades frente a la posición o a la identificación de ciertos elementos, a un escaso número de células contabilizadas. Una correcta enumeración debe ofrecer un resultado reproducible y con una precisión de ± 3 %.

La aparición de filtros «millipore» cuadriculados permite la numeración global de los elementos en suspensión de un líquido tras filtración sobre dicho filtro.

Numeración sanguínea. — Es la más frecuente. Se utiliza una pipeta portadora de una pequeña ampolla hacia su extremo superior y tres divisiones: 1, 2 y 101. Si se coge sangre hasta la división 1, la dilución final es del 1 %, si se coge hasta la división 2, será 1/200. El líquido que habitualmente se hacer servir para la dilución es el de Marcano: sulfato de Na: 5 g + formol: 1 ml + azul de metileno: 0,01 g + agua: 100 ml.

La observación para hacer el contaje se hace a unos aumentos que oscilan de los 200 a los 400. Los leucocitos son refringentes y quedan teñidos de color azul, los hematíes quedan grisáceos (figs. 94 y 95).

Antes de depositar la dilución en la cámara debe homogeneizarse la mezcla haciendo girar la pipeta durante unos 2 minutos, en posición oblicua.

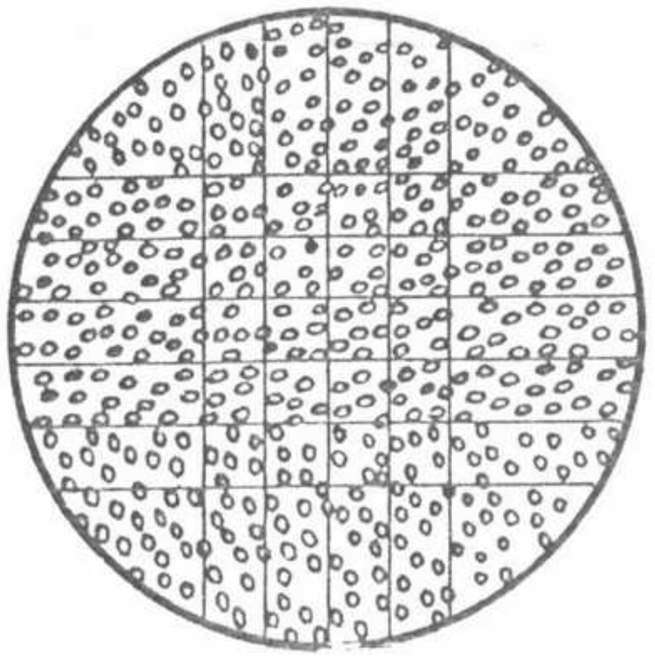


FIG. 94. — *Aspecto de un rectángulo de la cámara de Melassez con sangre normal diluida 400 veces.*

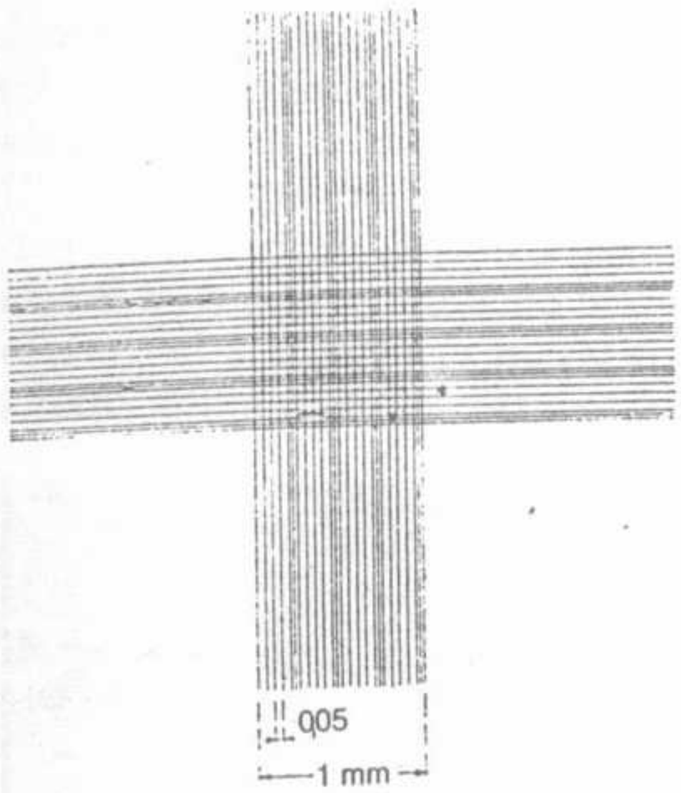
El contaje de los reticulocitos se efectúa tras haber producido una hemólisis con una cantidad igual a la de la sangre del siguiente líquido: azul de cresil brillante: 1 g + ClNa: 0,8 g + agua: 100 ml, filtrar antes de usar.

Siempre se debe proceder a contar de 200 a 300 células y expresarlas con relación al milímetro cúbico, multiplicando por 10 000 en una dilución del 1 % (fig. 96).

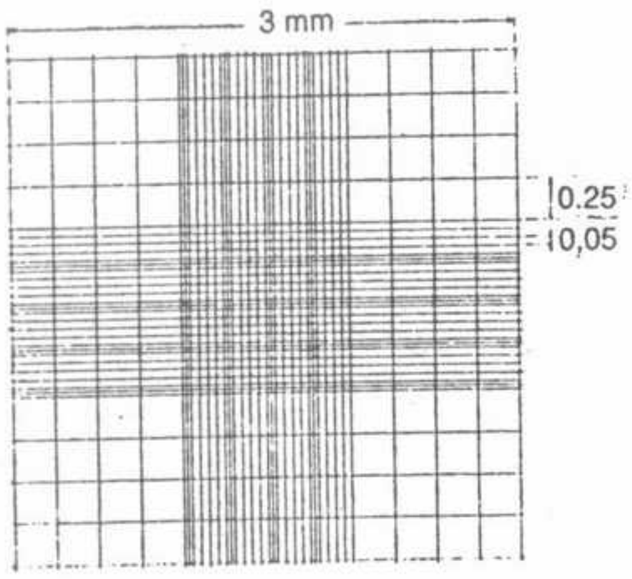
En una cámara de numeración no podemos establecer una distinción entre los distintos tipos celulares, únicamente pueden diferenciarse los hematíes de los leucocitos. Una vez hecha una numeración global de los mismos, deberán establecerse los porcentajes de los diversos tipos sobre una extensión previamente teñida (fig. 97).

Los eosinófilos destacan perfectamente bien en una cámara de numeración si previamente se tiñen de rojo intenso con el líquido de dilución de Randolph: mezclar a partes iguales, antes de usar los dos líquidos: **A**: azul de metileno al 0,1 % en propilen glicol: 50 ml + agua: 50 ml, y **B**: floxina al 0,1 % en propilen glicol: 50 ml + agua: 50 ml.

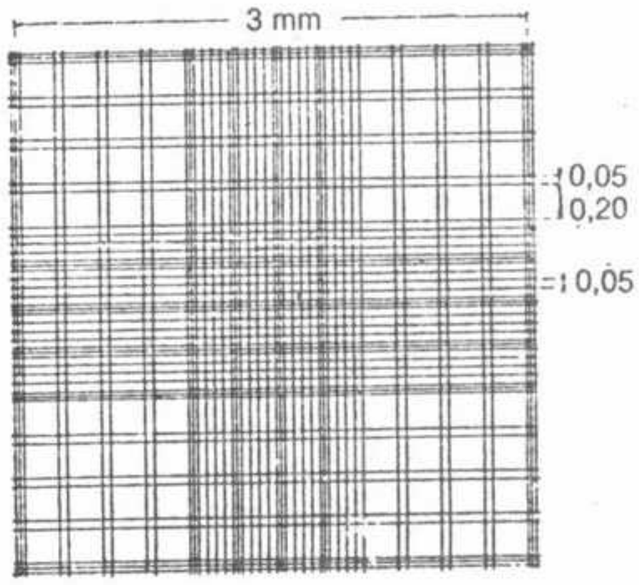
El contaje de los trombocitos (plaquetas) debe hacerse en contraste de fases, previa hemólisis de los hematíes en la siguiente solución: clorhidrato de cocaína: 3 g + ClNa: 0,2 g + agua: 100 ml.



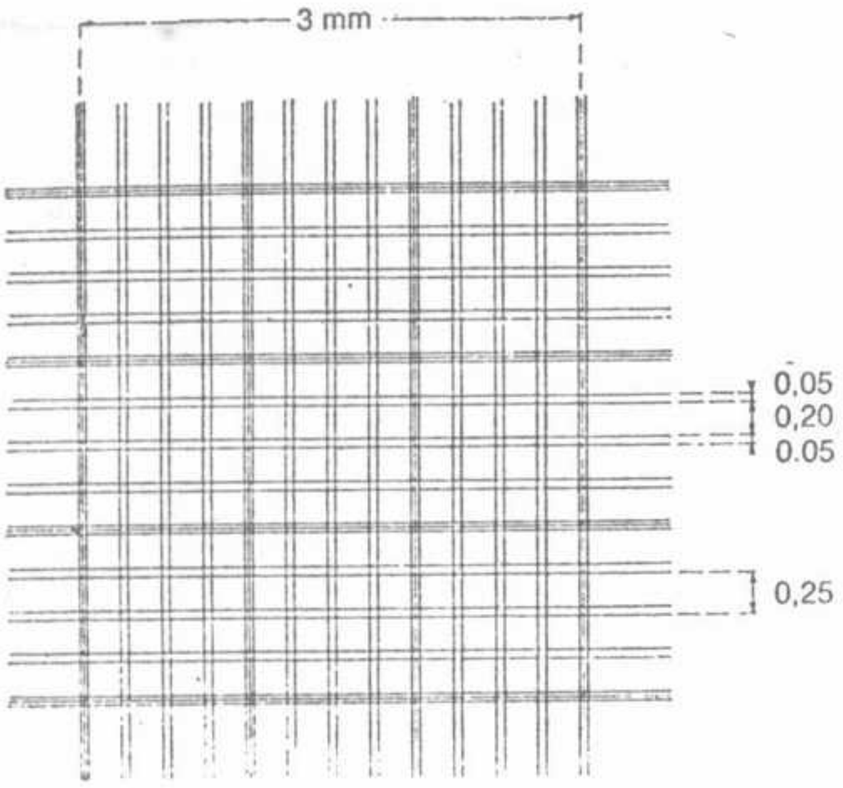
Retículo Thoma



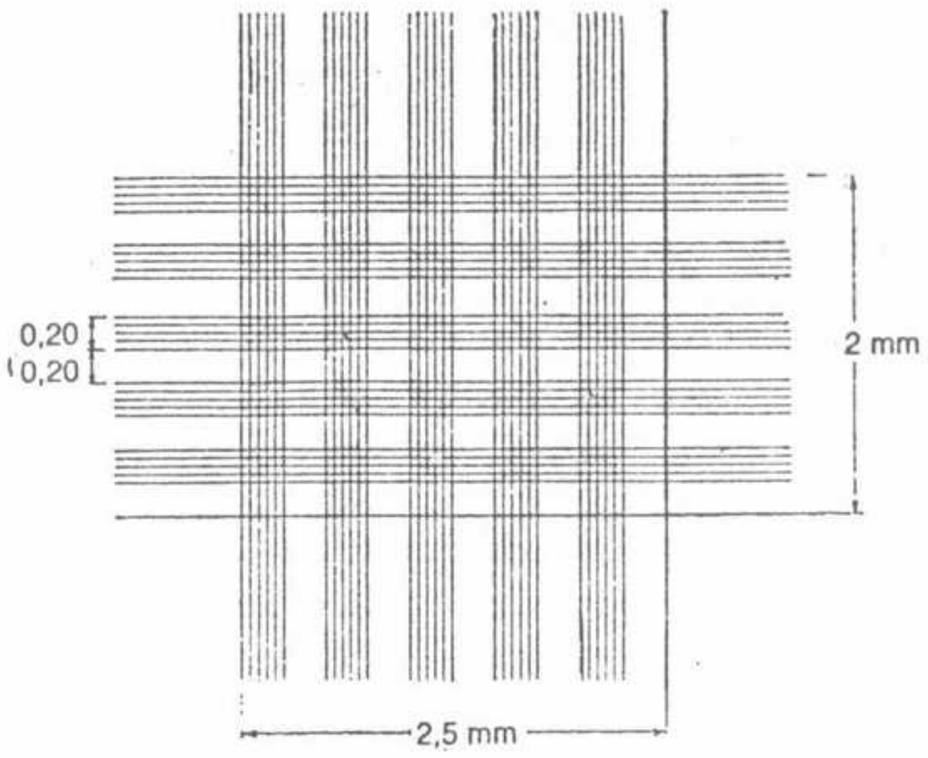
Retículo Neubauer



Retículo Türk



Rètículo Bürker



Retículo Malassez

FIG. 95. — *Principales cuadriculados de celdas de medición.*

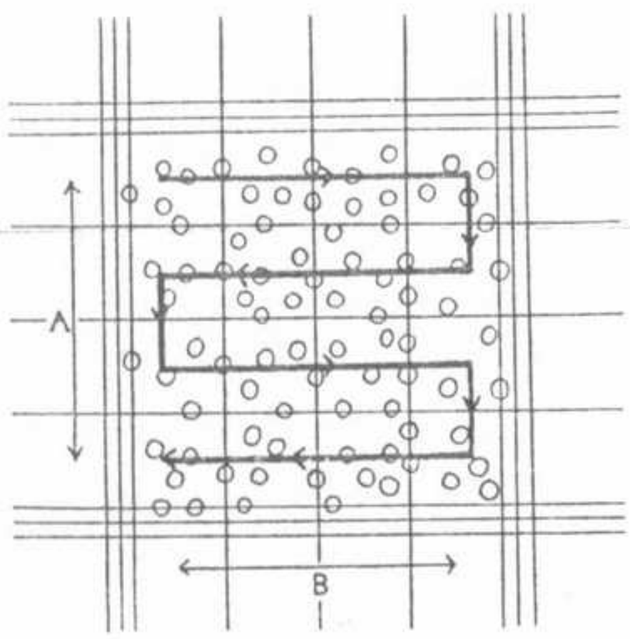


FIG. 96. — *Camino a recorrer para las enumeraciones.* No se contabilizan los hematíes que están cabalgando sobre el primero de los tramos triples sobre los lados A y B.

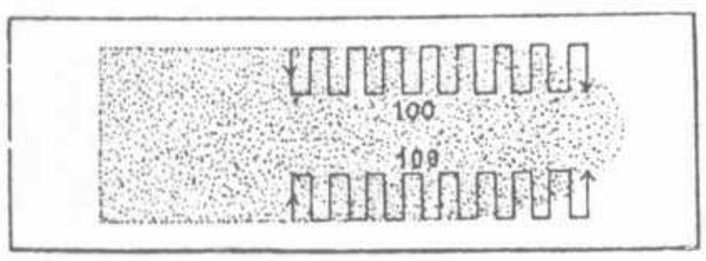


FIG. 97. — *Contar así 100 leucocitos de cada lado de la extensión sanguínea para establecer la fórmula leucocitaria.*

Limpieza de las pipetas. — Es perfecta cuando la bola de vidrio no se adhiere a la pared. Es por ello que deben lavarse inmediatamente tras haber efectuado la numeración:

1. Colocar la tetina a la punta y empujar el resto de sangre diluida.
2. Aspirar ácido acético.
3. Lavar con agua destilada varias veces.
4. Lavar dos o tres veces con alcohol absoluto.
5. Lavar con éter dos o tres veces, dejando escurrir, no debe soplarse.
6. Dejar secar o inyectar aire caliente (con una pera doble).

Si se hacen sucesivos contajes, entre uno y otro debe lavarse la pipeta con agua destilada (2 o 3 veces) y después con el líquido que sirve para hacer la dilución (2 veces).

No debe dejarse secar nunca la sangre dentro de la pipeta; en caso de que esto ocurra, limpiar el tubo capilar con una crin de caballo o aspirar un poco de ácido acético cristalizable y seguidamente lavar como se ha indicado anteriormente, tras disolución del coágulo, o mejor disolverlo mediante una digestión artificial, a 37 °C, con

una solución de 0,1 g de pepsina en 100 centímetros cúbicos de ácido clorhídrico al 1 %.

Lacar las cámaras de contaje con agua destilada y después con alcohol.

MORFOMETRÍA Y ESTEREOLOGÍA

Dada la variedad de formas individuales que oscilan alrededor de la forma típica de una estructura biológica, se sabe desde hace tiempo que los únicos métodos de medición válidos, fiables, son los métodos estadísticos. Pero surgen numerosos interrogantes: ¿cómo hacer el muestreo?, ¿cómo convertir medidas de longitud en medidas de superficie o de volúmenes, y con qué precisión? Estos son unos cuantos de los problemas que suscita la «morfometría» o estudio de las medidas de los componentes de las formas y de su aspecto: la «estereología», o estudio de sus volúmenes.

Supongamos que una estructura microscópica contenga, en volumen, granos desiguales de dos componentes A y B. Cuando se obtiene un corte con el micrótomo, ante todo, la superficie de la sección obtenida debe contener suficientes elementos representativos de cada componente, para que el análisis estadístico subsiguiente tenga un significado. Si las condiciones operatorias lo permite, podemos acumular las mediciones sobre varios cortes sucesivos a fin de que se cumpla esta condición.

El análisis experimental ha permitido establecer dos principios de proporcionalidad:

1.° En un corte delgado, suficientemente bien planchado, las superficies de las secciones de los componentes A y B son proporcionales a los volúmenes ocupados en el volumen total por estos compuestos.

2.° En una serie de varios cortes delgados del mismo volumen ocurre lo mismo.

Inmediatamente, puede deducirse que si el corte o las series de cortes están suficientemente bien extendidas puede reducirse la determinación de volúmenes a una determinación de superficies relativas.

La medida precisa de las superficies puede hacerse con la ayuda de los métodos enumerados en la página 79. Pero todos estos métodos son largos. Por esto se ha buscado otro sistema más sencillo y más rápido. Este método procede de un análisis por recurrencia: dado que es posible deducir un volumen de una superficie, ¿por qué no sería posible deducir la superficie a partir de un análisis lineal o puntual? (figs. 98 y 99).

Consideremos un corte de un objeto, en que la superficie de los dos componentes A y B ocupan, a partes iguales, la superficie del campo observado. Cualquier punto, cogido al azar en el campo de observación, tiene una misma probabilidad de caer sobre la parte A del objeto que sobre la parte B. Esta probabilidad es pues del 50 %. Un planteamiento sencillo demuestra que si las relaciones existentes entre A y B no son más del 1/2, pero toman un valor x o y, la probabilidad para que un punto dado se encuentre en A o en B estará en relación x o y con el otro, o a la inversa. Fácilmente se aplica este razonamiento cuando

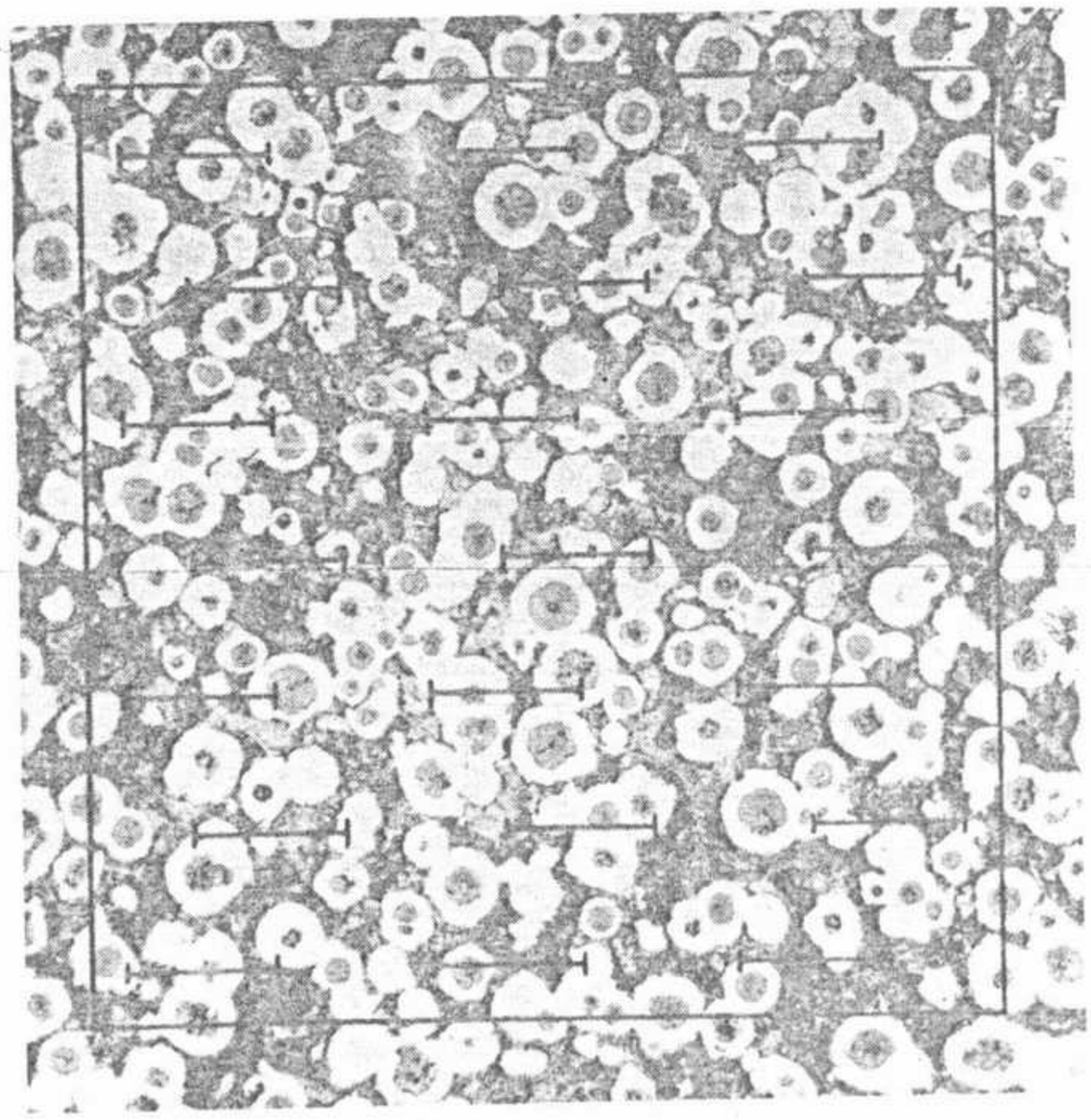


FIG. 98. — *En una preparación observada sobre un plano, la probabilidad de que un segmento derecho corte un objeto es proporcional a la relación entre el diámetro del objeto y el diámetro del campo en una dirección perpendicular.* Documento Wild-Heerbrugg.

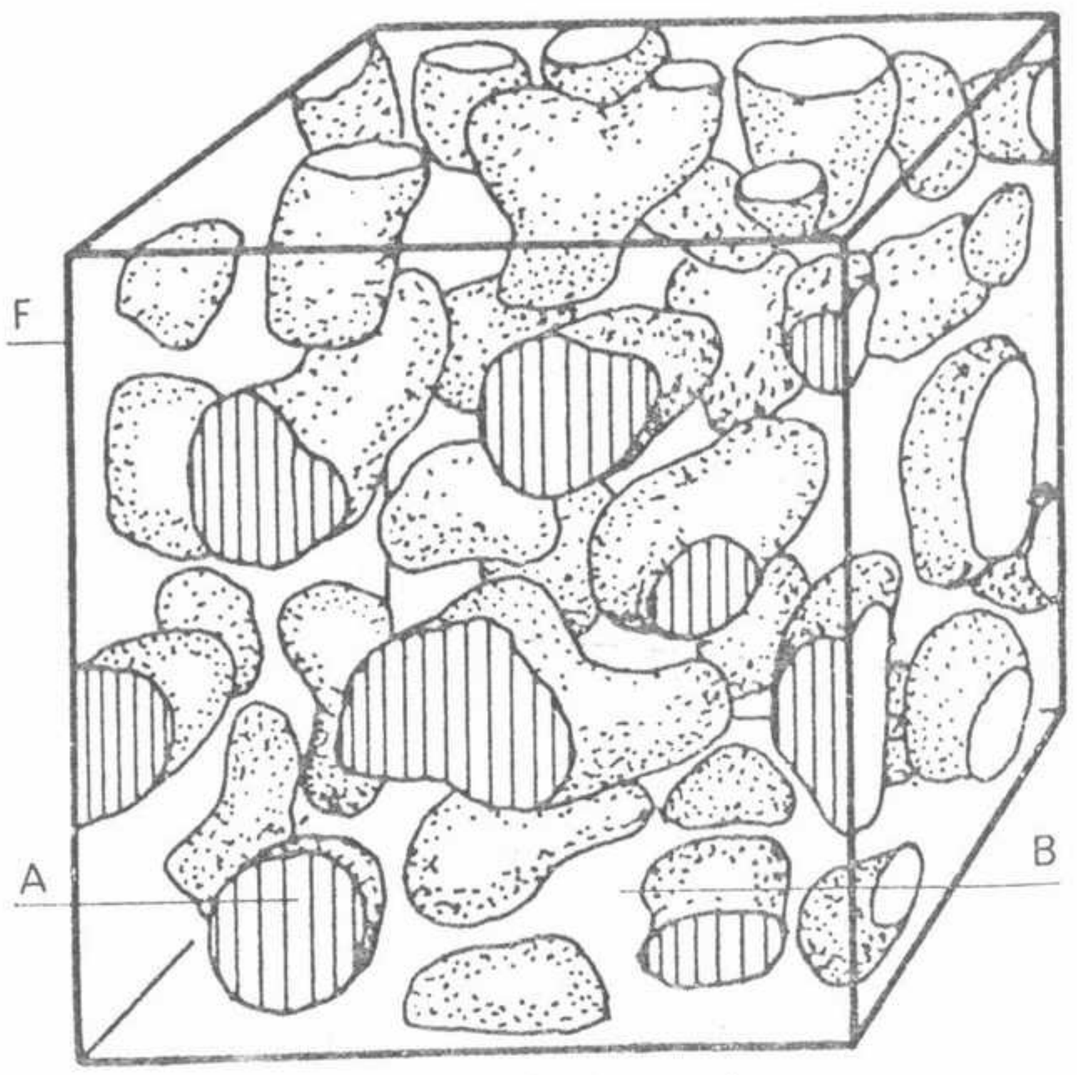


FIG. 99. — *Análisis estereológico: se descompone un volumen F en planos que contengan objetos A en una matriz B.* Documento Wild-Heerbrugg.

hay más de dos componentes, así como a más de un punto si éstos están suficientemente separados.

Se deduce un principio de mediciones que puede formularse así:

Para distribuir en clases, representativas de sus volúmenes respectivos, los componentes de una sección delgada del objeto microscópico, debe ser y es suficiente para fijar sobre una red preestablecida, puntos equidistantes, el número de puntos situados sobre cada constituyente. Si el número de puntos es suficientemente grande con relación al número de constituyentes, este contaje es proporcional a las superficies, y por consiguiente a los volúmenes relativos de los componentes.

En la práctica se utiliza un ocular cuya retícula está formada por puntos cuyo número generalmente está comprendido entre 25 y 42. El contaje, para incrementar la precisión, se hace sobre varios campos del mismo corte; observar sobre varios campos, diversos cortes sucesivos. El número total de puntos será, en este caso, igual al número de puntos por campo, multiplicado por el número de campos contabilizados. Una sencilla regla de proporcionalidad establece dichas relaciones. Conviene hacer un cálculo de errores para estar seguros de haber contado suficientes puntos representativos de componentes poco frecuentes. Remitimos al lector a los métodos de utilización de estos aparatos denominados «integradores», o a los tratados especializados sobre los cálculos de errores, para mayor precisión. Los ábacos darán los resultados del cálculo de la dispersión en %, en función del número de puntos contados y la proporcionalidad de los puntos testados sobre el componente analizado. Digamos rápidamente que para obtener una dispersión superior al 5 % deben hacerse 80 mediciones si la proporción del componente es del 0,9, 150 si es del 0,6, 700 si es de 0,4, 1700 si es de 0,2 y 3000 si es de 0,1. De ello se deduce una regla práctica: 100 mediciones sobre un componente son ampliamente suficientes cuando es aceptable una precisión del orden del 5 %, sobre un componente que se halla presente en un 1 %. ¡Cinco % de 1 %, evidentemente!

Caso de las partículas únicas en su composición pero de diversas formas. — Es un caso frecuente que conduce directamente al contaje automático, o al análisis de superficies o de volúmenes ocupados por un objeto de naturaleza única, pero dispersado de forma más o menos aleatoria en formas, en volumen medio y en dilución. El contaje de eritrocitos de la sangre es un caso particular y sencillo.

Cuando se corta un objeto que tiene un solo componente dispersado en un cuerpo sólido se aprecia en cada corte la presencia de estos objetos por secciones de formas y de dimensiones variables, dado que no existe ninguna razón, sólo la estadística, para que el corte pase por el mayor diámetro del objeto en cuestión. La probabilidad de que una correcta exploración corte tal objeto se halla en la relación existente entre el diámetro de este objeto y el diámetro del corte, en una dirección perpendicular al barrido. Si se multiplican las derechas del barrido, multiplicamos las probabilidades de intersección. Se demuestra que a excepción de los componentes esféricos, la relación entre el número contado de intersecciones y la superficie ocupada por el objeto sobre las secciones, depende de la forma de su volumen medio y de la orientación del objeto. Se han ideado retículos de forma sinusoidal para eliminar el efecto de orientación, así tenemos por ejemplo la trama de Merz. Se determina la influencia de la forma de la partícula sobre las mediciones, bien sea mediante un cálculo, si la forma es geométrica simple, bien sea por experiencia si es de forma geométrica compleja, pero en ocasiones esta experiencia es muy difícil de adquirir.

Toda medición de esta naturaleza, como en todo tipo de contaje, comporta tener en cuenta las tangentes, pero únicamente en dos direcciones, de las cuatro posibles, paralelas a los bordes del cuadrado explorado. Para mayor detalle, consúltense las obras más especializadas.

Una excelente presentación e introducción general sobre este tema puede hallarse en *Mikroskopion*, de A. Schaefer, marzo de 1970, con citas bibliográficas de los principales artículos de aquella época.

La práctica de la microestereología puede ser totalmente manual: el operador elige el campo, cuenta por clases, de naturaleza o de densidades, los objetos presentes bajo puntos o interceptados por segmentos del retículo. Pero también puede recurrir a aparatos más o menos automatizados. El primer paso de la automatización es el avance de la platina. Dos micromotores con reductores se sitúan sobre las coordenadas *x* e *y* de la platina, un interruptor especial cuantifica los movimientos desplazando la preparación del diámetro del campo cada vez que el operador lo desee. Segunda fase de la automatización: sustituir el ojo del observador por una célula fotosensible. El microscopio se convierte en un «Microcuantímetro». Este tipo de instrumento, extremadamente completo y preciso, ha sido diseñado principalmente pensando en aplicaciones metalúrgicas. Pero tiene numerosas aplicaciones biológicas a la vez que otras muchas insospechadas.

LOS MICROCUANTÍMETROS

Los «microscopios cuantimétricos» o «microcuantímetros» son instrumentos que permiten

una práctica automatizada de la morfometría y de la estereología.

En principio, se basan en microfotómetros o en microespectrofotómetros, asociados con una unidad de tratamiento de la información, que permite una serie de posibilidades, atendiendo a su complejidad y su programa:

— la impresión por teletipo de la matriz representativa de las densidades ópticas con el barrido en zigzag del objeto;
— la representación trimensional de las densidades ópticas obtenidas por el mismo barrido;
— el análisis estadístico y la clasificación de longitudes, superficies y volúmenes, tras selección, atendiendo a uno o varios parámetros, como son: dimensiones lineales, densidad óptica, forma de las partículas, etc.;
— el contaje sistemático de una clase de objetos;
— el trazo de la curva de distribución de frecuencias simple o acumulada;
— la comparación automática con objetos tipo y su contabilización;
— el reconocimiento de las formas, el análisis del factor de formas;
— el análisis de texturas;
— la «limpieza» de las imágenes para eliminar el ruido de fondo o los objetos carentes de interés; la erosión progresiva de las estructuras;
— la medida de los contornos lineales o perímetros de objetos;
— la frecuencia de un segmento en un componente;
— la distribución de las longitudes de tramas: perforadas o entrecruzadas;
— la covarianza de dos puntos, de dos componentes;
— el análisis de las superficies de contacto o de revestimiento;
— el análisis de la señal de vídeo, en frecuencia y en varianza;
— la contracción-dilatación de las imágenes y el análisis de proximidad;
— el análisis de la porosidad;
— el análisis del complemento de partes de imágenes incompletas;
— la transformación de Golay;
— la memorización para comparar posteriormente;
— el análisis «escorpiode» de los contornos según una matriz cuadrada o hexagonal;
— la observación y señalización de anisotropías de posición;
— la clasificación atendiendo a la relación nucleocitoplasmática;
— el trazo automatizado de las líneas de equidensitometría;
— la inversión de contrastes;
— el marcado y la transferencia de coordenadas;
— la digitalización de la imagen hasta 64 niveles de gris.

X. — MICROANÁLISIS FISICOQUÍMICO

MICROELECTROFORESIS DE CÉLULAS

Preparación de la célula mediante la técnica de Choucroun

La célula (fig. 100) consiste en una lámina de vidrio espeso (de unos 6 mm) con caras paralelas (42 mm × 32 mm). En la cara superior de la célula se encuentran dos ranuras en forma de U, de unos 10 mm de sección y en conexión con una pequeña ranura (AB) rectangular, de unos 0,6 mm de longitud, 1 mm de ancho y 0,15 mm de profundidad. Las superficies planas están afiladas y pulidas como piezas ópticas, al igual que el fondo de la ranura AB.

Para preparar la célula debe cubrirse su cara superior con una lámina de vidrio que se fija mediante parafina fundida.

El fondo de los tubos en U están repletos de gelatina caliente y viscosa (solución formada por 40 g de gelatina pura en 100 cc de ClK normal). Se deja enfriar la célula hasta que la gelatina se solidifique y haga una separación completa entre los compartimentos.

Los compartimentos E y F están llenos de la solución que debe estudiarse. Estos compartimentos son cerrados posteriormente con parafina caliente que se deposita lentamente sobre la célula.

Los compartimentos C y D están llenos de una solución de ClK normal y los electrodos se introducen en la solución.

La célula queda completamente cerrada y sellada, siendo esto una garantía de seguridad completa a la vez que queda garantizada la esterilidad deseada durante las manipulaciones y en el trans-

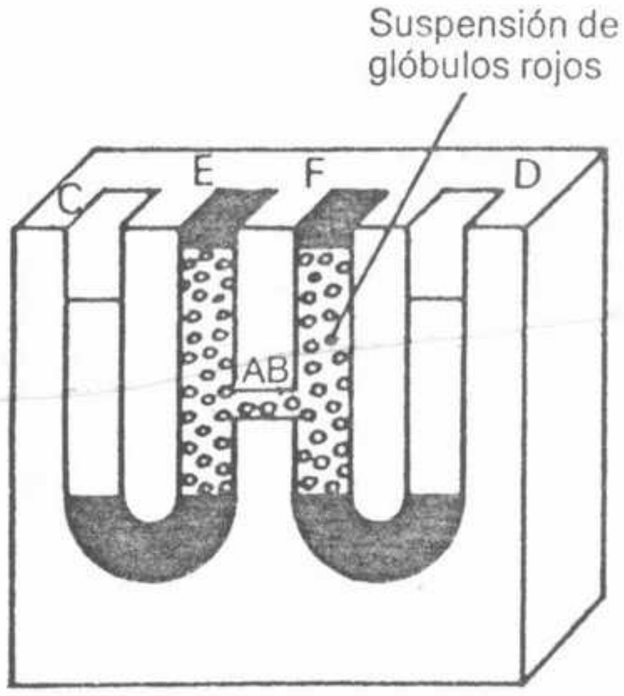


FIG. 100. — *Cubeta de electroforesis de N. Choucroun.*

curso de la experiencia. La laminilla de vidrio delgado permite hacer cualquier observación a grandes aumentos e incluso con el objetivo de inmersión.

El principio de esta célula consiste en concentrar la mayor parte de la energía del campo eléctrico en los medios sometidos a electroforesis, de manera que, en el campo existente en las proximidades de los electrodos, los iones H y OH, que se forman forzosamente, avanzarán con una velocidad suficientemente lenta como para no llegar a alcanzar, durante el ensayo, la solución a observar.

En esta célula, el campo eléctrico está prácticamente concentrado en la región AB, por dos razones fundamentales:

1:° La escasa relación existente entre la sección de la cámara AB y la sección de las ranuras en forma de U.

2.° La gran conductividad de la gelatina y de la solución de ClK 1 N de los electrodos, en comparación con la conductividad de la solución problema. (Este dispositivo tiene una gran eficacia cuando la suspensión a observar tiene una conductividad débil.)

MICROMÉTODOS TÉRMICOS

Los micrométodos térmicos se basan sobre los principios establecidos por L. y A. Kofler para el análisis microquímico. Requieren un microscopio, preferentemente de luz polarizada y de una platina caliente, que permitirá reconocer si dos sustancias forman entre ellas una eutéctica sencilla, compuestos moleculares o cristales mixtos, junto con otros accesorios de menor importancia.

Microplatinas calefactoras. — En el centro de una cámara de vidrio se coloca un soporte de la preparación que puede desplazarse mediante mandos exteriores al mismo, un termómetro o una sonda termométrica asociada a un aparato de medición; se trata de una resistencia calefactora alimentada por una corriente regulable. Las platinas con ventana sencilla no pueden sobrepasar los 300 °C sin evitar el riesgo de estropear el objetivo. Si se calienta más será necesario disponer de una platina con doble ventana con el vacío practicado entre los dos vidrios (fig. 77).

Microplatinas refrigeradoras. — Tienen la misma concepción que las anteriores pero conllevan un dispositivo de refrigeración, basándose en el efecto Pelletier, o bien un circuito en el que se puede hacer circular gas carbónico. Un dispositivo auxiliar de calentamiento permite hacer un recalentamiento rápido entre dos observaciones. Generalmente, se puede pasar de –50 a +80°.

Algunos de estos dos tipos de platinas comportan un dispositivo electrónico de control de la temperatura, de la velocidad con que se alcanza la temperatura deseada y de registro automático (fig. 77).

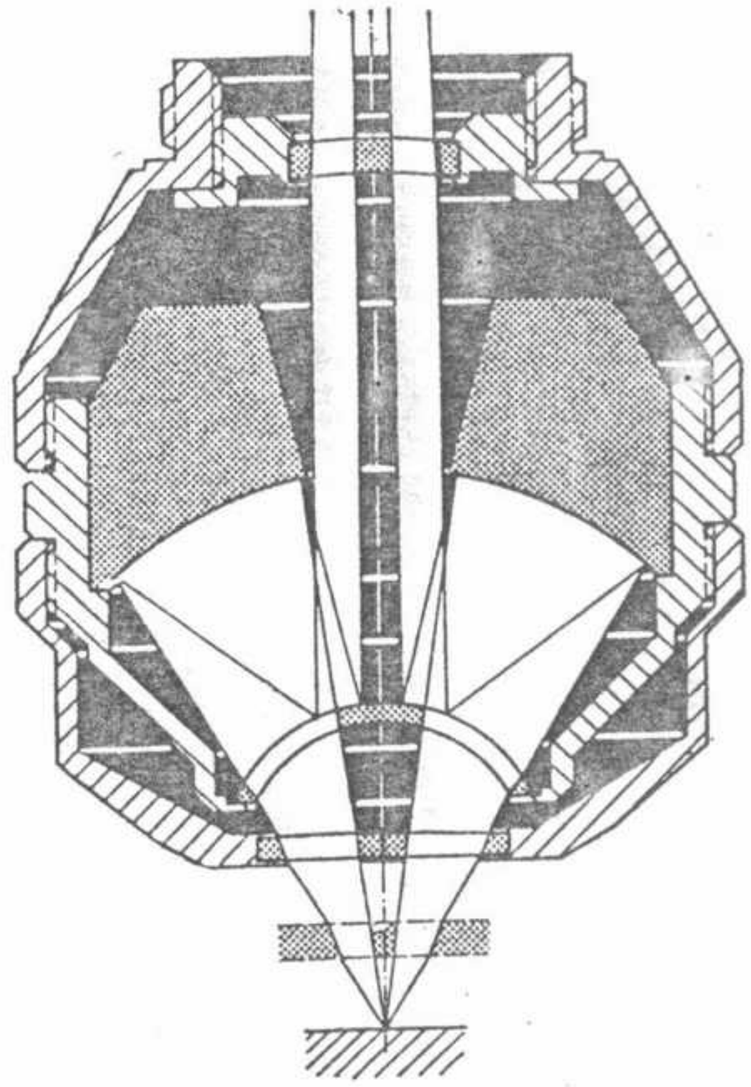


FIG. 101. — *Objetivo con espejo de gran distancia frontal para la observación de objetos sometidos a altas temperaturas, Reichert según Nomarski.* Aumento 40, AN 0,52, dist. frontal 8 mm. Documento Reichert.

Bloque de microsublimación. — Se trata de una cámara hermética que tiene una ventana en la que se puede hacer un vacío parcial en caso de que convenga. Se coloca en el interior de una microplatina calefactora.

Protector de objetivos. — En determinados casos, puede ser interesante trabajar sin ventana. Los vapores corrosivos o simplemente opacos pueden depositarse sobre la lente frontal del objetivo. Para protegerla es recomendable engancharle temporalmente un pequeño cubreobjetos con la ayuda de una gota de aceite o de glicerina y sacarla tras su uso.

MICRORREFRACTOMETRÍA

La medición de los índices de refracción es esencial para quien haga determinaciones microquímicas. Dado que esta medición debe hacerse sobre pequeñas cantidades de determinados compuestos, líquidos o sólidos, nos construiremos dos series de cuerpos de referencias sólidos y líquidos. Sumergiendo el compuesto desconocido en un líquido de índice de refracción conocido, o viceversa, se apreciará la igualdad de los índices a temperatura estándar de 20 °C, porla ausencia de visibilidad del compuesto. Si hay una pequeña di-

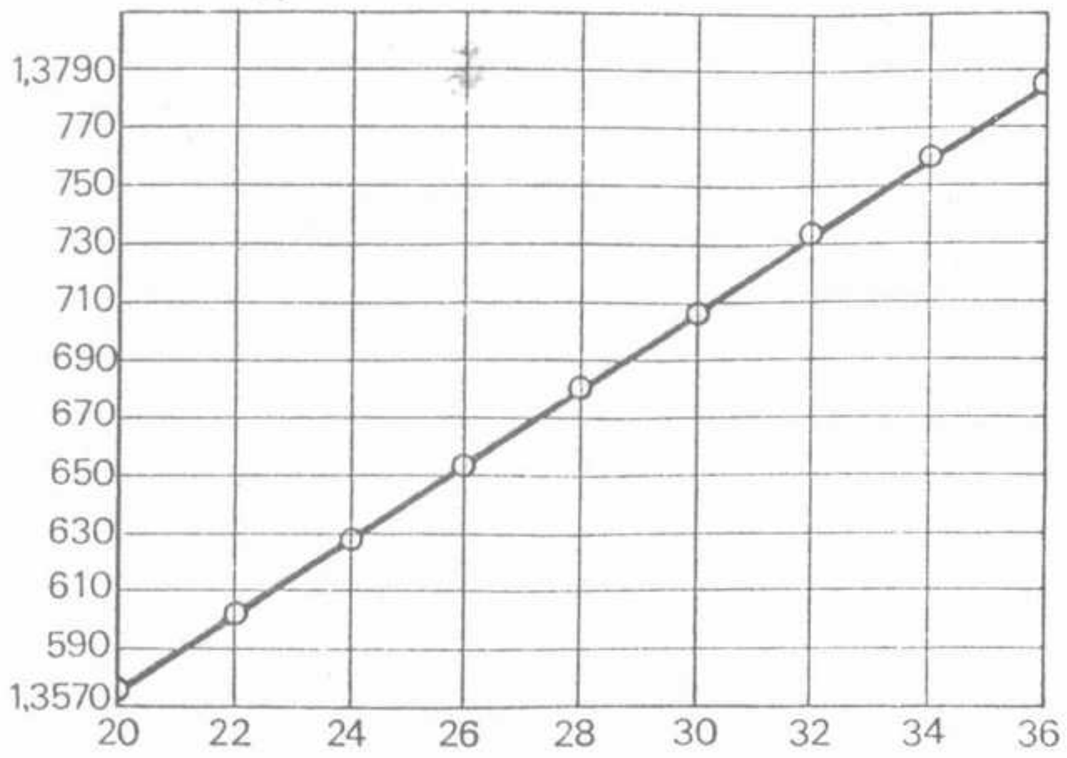


FIG. 102. — *Índice de refracción de una mezcla agua-glicerina; % de glicerina en abscisas, índices en ordenadas.*

ferencia de índice de refracción, el método del ribete de Schroeder van der Kolk permite saber si el índice del cuerpo sólido es más débil o más fuerte que el del medio líquido en el que está sumergido. Ello se logra de la siguiente manera: se hace una iluminación lateral en fondo claro, cerrando la mitad del diafragma de abertura del condensador, seguidamente se desenfoca ligeramente la imagen hacia arriba y después hacia abajo, observando cuidadosamente el desplazamiento de la primera franja negra de difracción o de la franja brillante que se encuentra entre ella y el objeto. La figura 30 resume las conclusiones que deben extraerse.

LÍQUIDOS ESTÁNDAR DE LA CASA KODAK PARA LA DETERMINACIÓN DE ÍNDICES:

	n_D 20 °C
Alcohol metílico	1,3288
Agua	1,3330
Acetona	1,3592
Acetato de etilo	1,3727
n-hexano	1,3755
n-heptano	1,3872
Alcohol n-butílico	1,3991
Cloruro de n-butilo	1,4023
1,4-dioxano	1,4222
Metilciclohexano	1,4235
Etilen glicol	1,4318
Citrato de etilo	1,4434
Cloruro de etileno	1,4453
Cloruro de trimetileno	1,4476
Ciclohexanona	1,4507
Ciclohexanol	1,4678
Dietanolamina	1,4782
Trietanolamina	1,4853
p-cimena	1,4908
s-tetracloetano	1,4943
Tolueno	1,4957
Benceno	1,5017
Yoduro de etilo	1,5138
Anisol	1,5178
Bromuro de trimetileno	1,5238
Clorobenceno	1,5250
Yoduro de metilo	1,5310
Bromuro de etileno	1,5383
o-nitrotolueno	1,5466
Nitrobenceno	1,5526
tri-o-cresil fosfato	1,5582
Bromobenceno	1,5602
o-toluidina	1,5725
Anilina	1,5864
Bromoformo	1,5973
o-yodotolueno	1,6095
Quinaldina	1,6120
Yodobenceno	1,6205

CRISTALES ISÓTROPOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ÍNDICES:

Floruro de sodio	1,326
Fluosilicato de potasio	1,339
Fluoruro potásico	1,352
Fluosilicato amónico	1,370
Cianuro potásico	1,410
Alumbre sódico	1,430
Alumbre potásico	1,456
Alumbre amoniacal	1,459
Alumbre crómico potásico	1,481
Alumbre férrico amoniacal	1,485
Cloruro potásico	1,490
Cloruro de rubidio	1,494
Acetato de uranilo sódico	1,504
Clorato sódico	1,515
Cloruro sódico	1,544
Bromuro de rubidio	1,553
Bromuro potásico	1,559
Sulfato crómico	1,564
Nitrato de bario	1,571
Nitrato de estroncio	1,586
Bromato sódico	1,617
Cloruro amónico	1,640
Bromuro sódico	1,641
Cloruro de cesio	1,642
Yoduro de rubidio	1,647
Clorostanato potásico	1,657
Yoduro potásico	1,667
Clorostanato amónico	1,678
Bromuro de cesio	1,698
Yoduro amónico	1,703
Bromuro amónico	1,711
Óxido de magnesio	1,736
Trióxido de arsenio	1,755
Yoduro sódico	1,775
Nitrato de plomo	1,782
Yoduro de cesio	1,788
Cloroplatinato potásico	1,825

Variaciones atendiendo a la temperatura. Este coeficiente varía atendiendo la naturaleza

del compuesto; siendo por ejemplo del orden de 0,000001 por grado C en el caso del vidrio y de 0,0002 a 0,0009 por grado en el caso de los compuestos orgánicos. Es por ello que siempre resulta conveniente trabajar a unos 20 °C para efectuar mediciones de la luz amarilla de una lámpara de sodio y anotar la temperatura con máxima precisión.

$n' = n - 0{,}0004\ \Delta t$ es una fórmula media de corrección.

Variantes ópticas de tipos de observación. — Algunos autores prefieren efectuar las medidas en contraste de fases, el objeto aparece con una placa de fases positiva más oscura, si el índice es más fuerte que el medio en que se halla y más claro en el caso contrario.

Si se dispone de un contraste de fases de tipo interferencial éste es sin duda el mejor método de observación; por la medición de las diferencias de trayectorias entre el objeto y el medio se puede calcular con precisión el propio índice en el caso de que sea ligeramente diferente del líquido o del cristal de referencia (cf. p. 42).

Cuando se trabaja con una suficiente cantidad de líquido podemos utilizar un microrrefractómetro de Nichols. Un biprisma recibe la gota del líquido problema, el índice es obtenido por la lectura del intervalo entre dos líneas después de haber efectuado la medición.

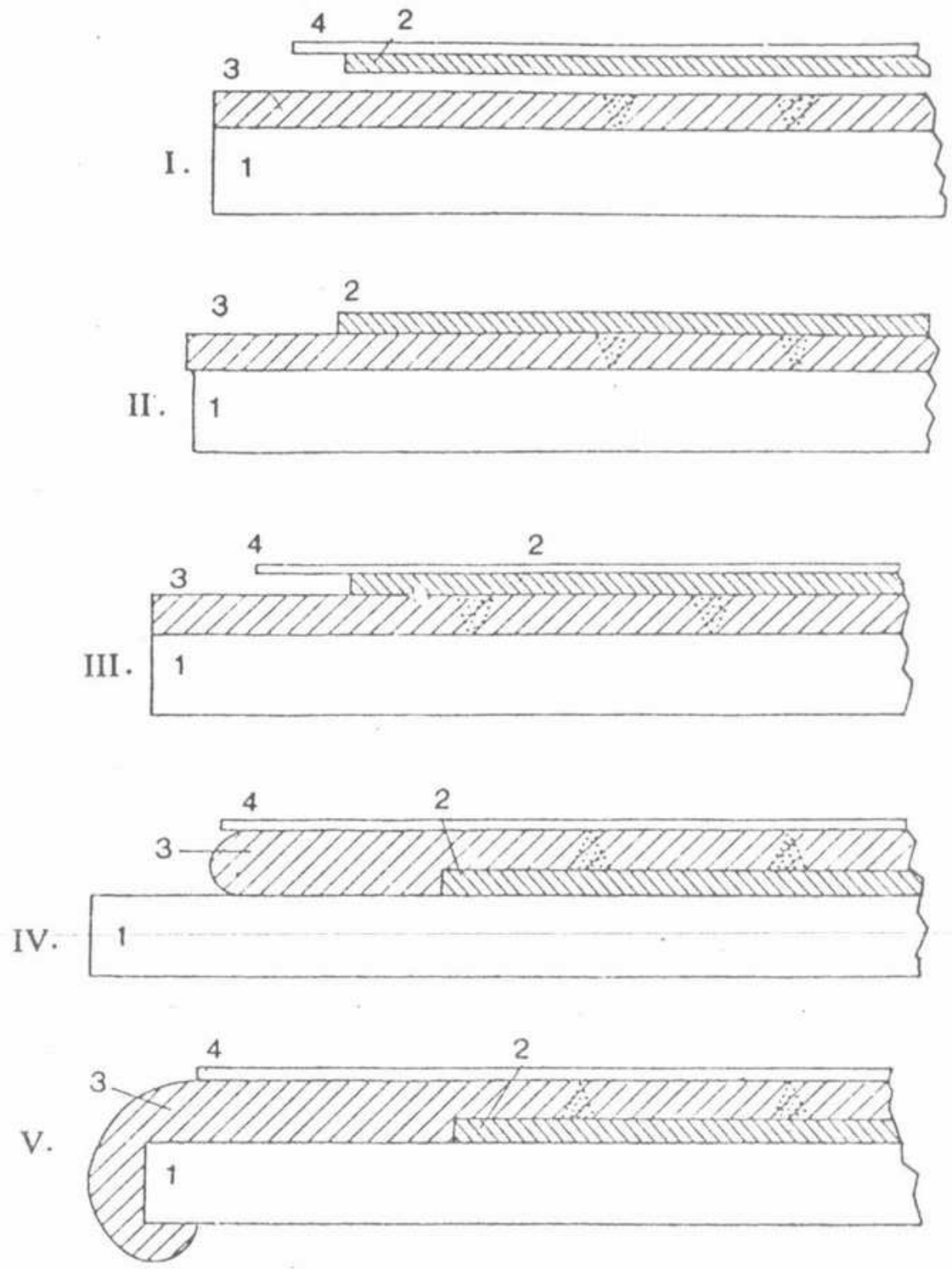


FIG. 103. — *Principio de los diferentes procedimientos de autorradiografía.* 1, lámina soporte (portaobjetos); 2, corte histológico; 3, emulsión radiosensible; 4, cubreobjetos. Según Policard, Bessis y Locquin.

AUTORRADIOGRAFÍA

Ha sido tras la utilización de marcadores radiactivos en biología que este método, conocido desde 1924, ha tenido resonancia. Las precisiones de localización obtenidas son de tal índole que algunas preparaciones han podido ser observadas con el microscopio electrónico. Pero, más que la localización estática de un compuesto, son sus desplazamientos a nivel tisular e intracelular lo que interesa, así como su duración de vida en la aplicación del método. Se trata de un método que no tiene rival.

Para ello se utilizan radioisótopos cuyo período de vida es de algunas horas hasta varios meses y que principalmente emiten rayos α y β (fig. 103).

La autorradiografía por contacto es la más frecuente y la más sencilla, pero sólo permite la localización a nivel tisular. Se extienden los cortes en seco o sobre el agua, sobre una emulsión fotográfica. El corte se halla pegado a la emulsión durante todo el procesado. Este sistema es mucho más ventajoso que el consistente en poner en contacto portaobjetos con una emulsión, en este caso hay grandes dificultades de reconocimiento. Deben escogerse procedimientos de tratamiento de cortes que no alteren ni tiñan excesivamente la emulsión fotográfica. Puede mejorarse considerablemente el método depositando el corte entre dos capas de emulsión.

La autorradiografía por impregnación ofrece resultados más precisos. Se impregna el corte con una emulsión fotográfica de un punto de fusión de unos 37°. También puede procederse haciendo deslizar la emulsión por una cara, interponiendo una capa de colodión entre las dos a fin de evitar difusiones.

La autorradiografía a través de películas consiste en recubrir el corte, colodionado, de una capa de una emulsión que podrá extraerse de su soporte.

Todas estas operaciones deben hacerse con iluminación inactínica.

Los tiempos de exposición pueden variar de algunas horas a varios meses.

Es la numeración de granos de plata tras el revelado lo que permitirá efectuar un estudio cuantitativo.

Algunos colorantes son debilitados o desaparecen en los baños de revelado o de fijación si se tiñe antes de llevar a cabo el revelado.

HISTORRADIOGRAFÍA

Es la existencia de una íntima relación definida entre la absorción de rayos X por una estructura y el número atómico de átomos presentes, que determina el gran interés de la historradiografía. Tras el éxito alcanzado con las sondas electrónicas su interés ha disminuido ligeramente, dado que un microscopio electrónico de barrido, convenientemente equipado, puede ofrecernos las mismas informaciones (cf. p. 101).

Los rayos X pueden utilizarse de tres maneras distintas: en microscopia propiamente dicha, en microrradiografía por contacto y en microrradiografía de sombras o de proyección.

La microscopia con rayos X requiere una fuente lumínica lo más puntual posible, focalizada por dos redes cristalinas mecánicamente curvadas y orientadas en ángulo recto. La incidencia del haz debe ser rasante y el rendimiento energético muy débil. Los resultados obtenidos por este sistema son bastante decepcionantes y no se ha conseguido comercializar ningún aparato. Una segunda vía, mucho más prometedora está en curso experimental por parte de uno de nosotros.

La microrradiografía por contacto tiene sus límites fijados por la extrema delgadez del manantial lumínico, el grano de la emulsión y, dado que el cliché debe ser observado con el microscopio fotónico, por su poder de resolución.

Únicamente una radiación muy débil, de longitud de onda comprendida entre 1 y 10 Å, emitida bajo una débil tensión es conveniente para este tipo de trabajos. Si se trabaja bajo un vacío potente es posible utilizar rayos más suaves todavía que $\lambda = 20$ a 50 Å. Los mejores resultados obtenidos permiten la observación de clichés con unos aumentos del orden de 800. En estos clichés, se localizan fácilmente los átomos pesados, sin obtener indicaciones sobre las combinaciones que presentan. Por comparación con una escala de hojas de nitrocelulosa podemos determinar la masa seca global de un corte, el contraste interferencial también posibilita esta observación, en fresco.

La microrradiografía de sombras o por amplificación tiene además de las mismas limitaciones que el método anterior, un límite suplementario: la dificultad de obtener intensidades convenientes para tener un tiempo de exposición suficientemente corto, aunque la fuente lumínica tenga suficiente delgadez.

Utilizando rayos X monocromáticos estos dos últimos métodos han permitido, gracias a las discontinuidades en las curvas de absorción, caracterizar algunos elementos químicos.

Este método tiene las mismas limitaciones que los anteriores y presenta mayores dificultades de puesta en marcha, dado que resulta difícil obtener una fuente lumínica estrecha e intensa para que el tiempo de exposición no sea excesivamente largo. Utilizando una lámpara de rayos X monocromáticos es posible detectar cuantitativamente algunos elementos por su absorción específica.

Puede utilizarse la radiación blanca, sincrótomo, producido por un anillo de colisión, dado que este rayo es muy intenso y permite conseguir grandes aumentos con tiempos de exposición cortos. Efectivamente, el instrumento produce una radiación continua desde el infrarrojo hasta los rayos X. La radiación potente y polarizada. Permite la obtención de tiempos de exposición mil veces más cortos que cuando se utilizan las lámparas convencionales.

ESPODOGRAFÍA

La microincineración es una histopodografía que revela el esqueleto mineral de una estructura, a través de un calentamiento que volatiliza todos sus componentes orgánicos. El resultado es la obtención de un «espodograma». En 1833, Raspail lo aplicó a células vegetales. Debió esperarse un siglo para que los trabajos de A. Policard le dieran justicia.

El espodograma da una imagen completa de la distribución global de las sales minerales en una célula. Se conservan las estructuras más delicadas, hasta tal punto que pueden ser observadas con el microscopio electrónico.

En el proceso de la fijación deberá desecharse cualquier líquido fijador que contenga o disuelva los minerales. El corte debe ser obtenido por congelación si es posible o por inclusión en parafina, debe desecharse la celoidina por sus propiedades explosivas que desintegrarían los cortes al incinerar el material. Obtenidos los cortes se procede a su extensión, sustituyendo el agua por el aceite de parafina y escogiendo portaobjetos resistentes al fuego: vidrio de fracción verde. Se introduce el portaobjetos en un tubo de cuarzo calibrado, rodeado de una resistencia calefactora y de una vaina de amianto u «horno de Policard», se eleva la temperatura de forma progresiva: 10 minutos para alcanzar los 70°, mantenerlo 5 minutos a esta temperatura para evitar la retracción de la colágena, seguidamente elevar la temperatura a 150° en 15 minutos, a fin de carbonizar toda la materia orgánica. Si en esta fase se frena el proceso se obtiene un «antracograma» negro. Elevando la temperatura hasta los 500° y dejando el portaobjetos durante unos 20 minutos a 600 °C durante algunos minutos se obtiene un espodograma blanco o ferruginoso según los casos.

Seguidamente se montan los espodogramas en seco, entre porta y cubreobjetos, interponiendo una cuña de grosor adecuado para evitar su aplastamiento: son higroscópicos y muy frágiles. Se observan en fondo claro o incluso mejor con iluminación incidente o en fondo oscuro, en contraste de fases o en contraste interferencial.

Pueden analizarse los espodogramas al microscopio electrónico de barrido para identificar los átomos medianos y los pesados.

Pequeños objetos pueden ser incinerados, *in toto,* así se procede con los protozoos, con los esporangios de los hongos, con las hifas o con las fibras vegetales.

XI. — MICROANÁLISIS ELECTRÓNICO

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

Es la prolongación hacia lo infinitamente pequeño del microscopio estereoscópico o lupa binocular. En lugar de observar el objeto por reflexión de fotones se buscan las informaciones de la superficie mediante un pincel delgado de electrones que la barren. Pero a diferencia del microscopio fotónico, no siempre son las partículas de la misma naturaleza las utilizadas para formar la imagen o analizar su composición (figura 104).

En la figura 105 se representa un corte longitudinal del aparato sin su fuente de alimentación y sin el sintetizador de imágenes que forma parte del aparato, así como sin los aparatos de medición colocados en diversos registros.

Cuando un haz de electrones incide, en el vacío, sobre un objeto, las partículas incidentes pueden ser absorbidas, pueden ser transmitidas o bien modificarse de distinta manera sus frecuencias. Los electrones transmitidos, tras la absor-

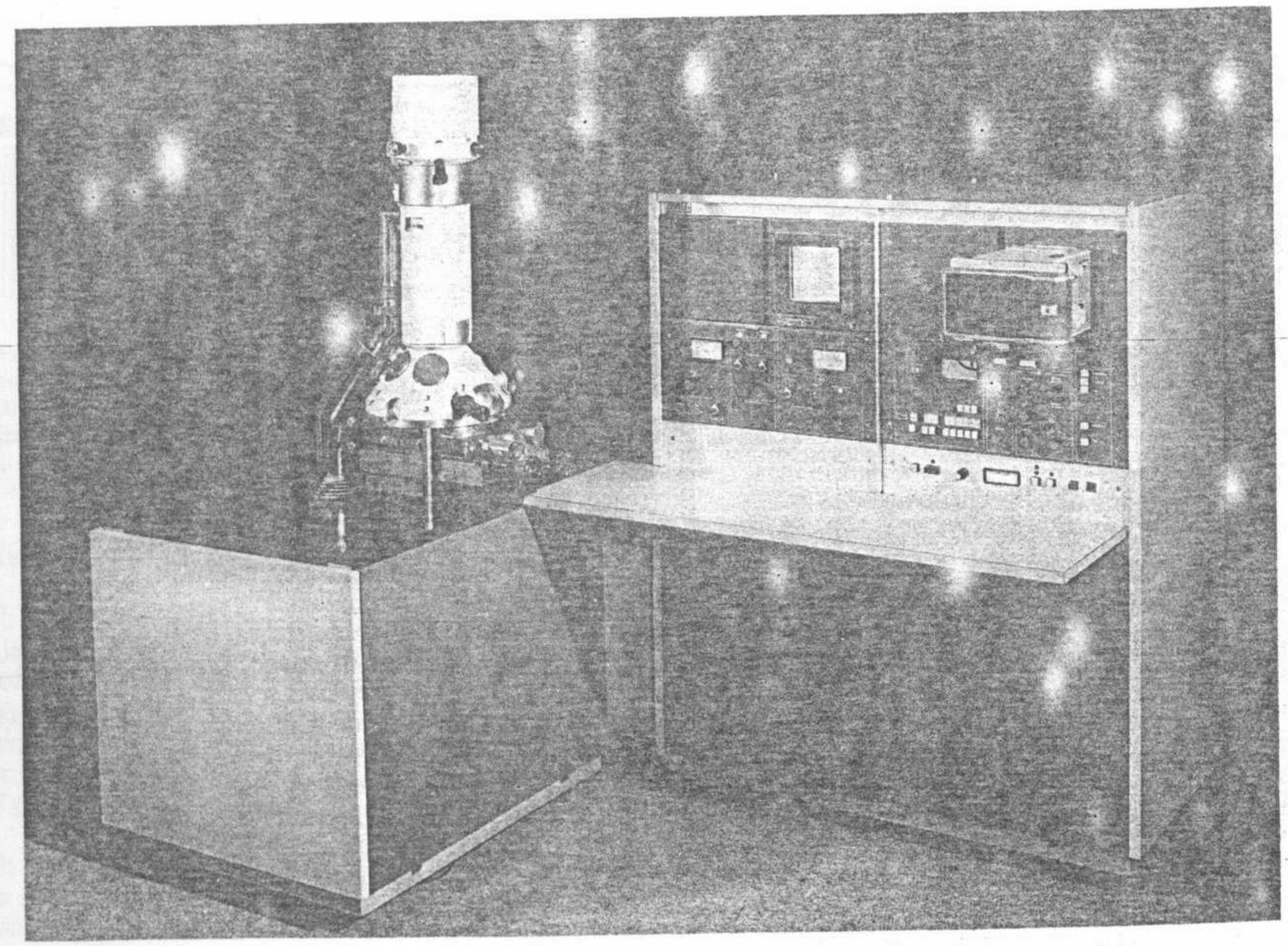


FIG. 104. — *Microscopio electrónico de barrido Camébax.* Documento Caméca.

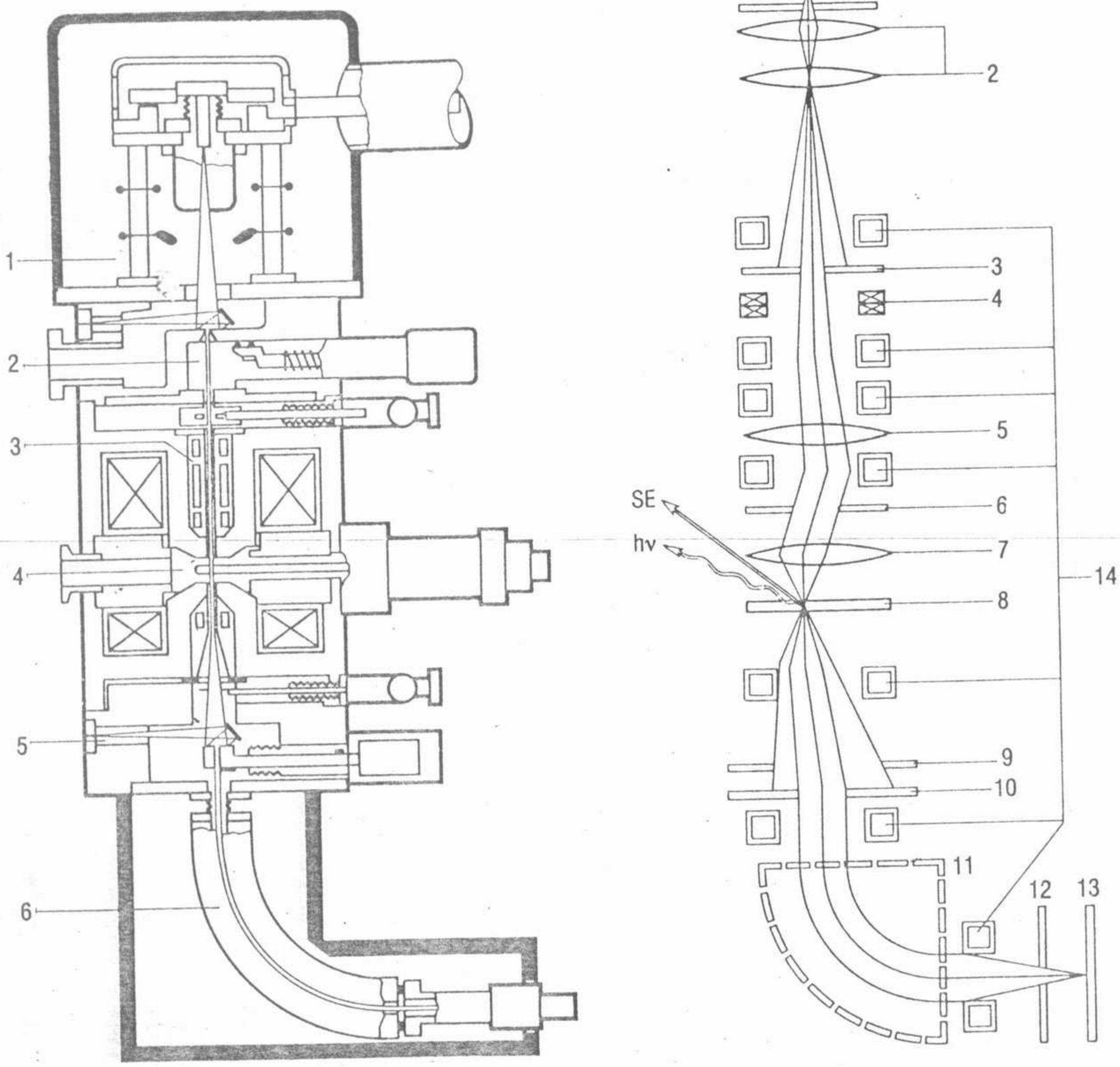


FIG. 105. — *Microscopio electrónico de barrido Elmiskop ST 100 F de Siemens; a la izquierda, corte del instrumento; a la derecha, esquema.* A la izquierda: 1, cañón de electrones; 2, cámara de diafragmas; 3, bobinas deflectoras; 4, cámara donde se coloca el portamuestras; 5, visor auxiliar; 6, guía de ondas. A la derecha: 1, filamento; 2, cilindro wehnelt; 3 y 6, diafragmas; 4, bobina; 5 y 7, lentes; 8, objeto; SE, electrones retrodifusados; hv, rayos X retrodifusados; 9, diafragma; 10, placa de detección; 11, guía de ondas; 12, diafragma; 13, placa detectora; 14, bobinas deflectoras sincronizadas. Documento Siemens.

ción parcial por parte del objeto, sirven para formar la imagen en el microscopio electrónico de transmisión, como en el microscopio fotónico de campo claro ocurría con los fotones. Los electrones pertenecientes a los tipos: Auger, retrodifundidos o secundarios pueden ser captados independientemente unos de otros y servir bien sea para formar la imagen, o bien para dar una curva espectral de análisis. Algo parecido ocurre con la «catodoluminiscencia» y los rayos X producidos. Los electrones retrodifundidos han rebotado sin perder energía sobre los planos cristalinos de la materia, los otros han experimentado una pérdida parcial de la energía, relacionada con la propia naturaleza de la materia en cuestión, lo cual permitirá efectuar el análisis.

El principio del microscopio electrónico de barrido (MEB o SEM), consiste, como en el caso de la televisión, en hacer coincidir punto por punto, la superficie de la muestra y la de la pantalla fluorescente, las informaciones dadas por los electrones secundarios, por los electrones retrodifundidos, por los electrones absorbidos y recogidos por captadores apropiados.

Los electrones secundarios, arrancados de sus órbitas por el bombardeo incidente, no son característicos de la muestra. Permiten formar una imagen completa y no selectiva de tal o cual com-

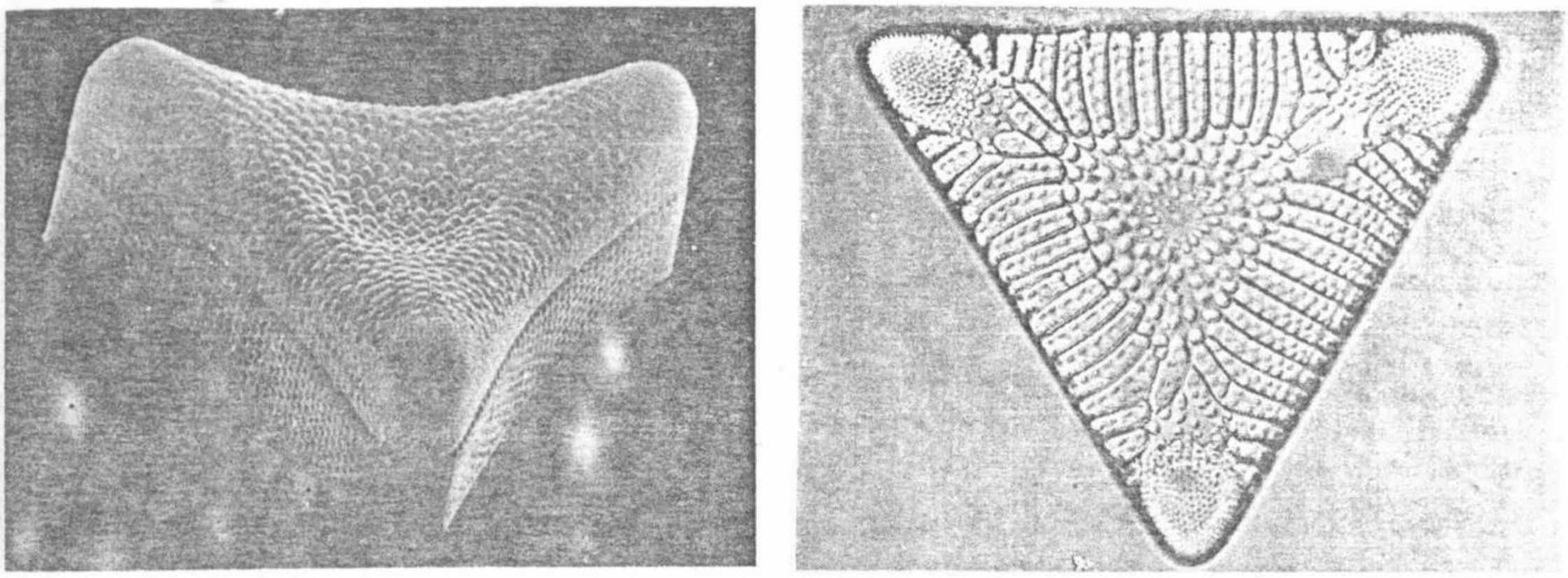


FIG. 106. — *Comparación entre las imágenes obtenidas con un microscopio fotónico por transmisión, a la izquierda y al microscopio electrónico de barrido a la derecha, de dos diatomeas muy similares:* Triceratium morlandii *Grev. a la izquierda y* Triceratium formosum *Brightwell a la derecha; a unos 1300 aumentos.* Obsérvese cómo la imagen obtenida con el microscopio electrónico de barrido es muy parecida a las imágenes que se obtienen con el microscopio fotónico estereoscópico, aunque los aumentos sean muy superiores con el primero. Documentos de P. Fusey el de la izquierda y de M. Ricard el de la derecha; Laboratorio de Criptogamia del Museo Nacional de Historia Natural, París.

ponente. Una metalización de la superficie del objeto permite mejorar la emisión de electrones, equilibrando las tensiones de polarización superficiales y compensando los débiles valores de masa atómica de algunos componentes de la muestra. Los componentes de la emisión secundaria hacen variar el contraste de la imagen. Entre estos componentes, el más importante es el ángulo de incidencia del haz, lo que conduce a la formación de una imagen que da la impresión de relieve, análoga a la que da un microscopio fotónico estereoscópico. El poder de resolución depende del grosor del haz de barrido y el casi paralelismo de éste asegura una gran profundidad de campo, superior a la del microscopio fotónico para un mismo aumento y con un poder de resolución incomparablemente mayor. El segundo componente está relacionado con la masa atómica de las moléculas bombardeadas; darán pues imágenes muy diferentes de los elementos pesados y de los ligeros. La imagen de los electrones absorbidos es prácticamente comparable a la de los electrones secundarios + los retrodifundidos (figs. 106 a 108).

Observación de las muestras congeladas. — Los materiales biológicos extremadamente frágiles presentan el riesgo de sufrir alteraciones en el transcurso de la metalización. Recordemos que es una condición imprescindible que el material a ser observado al microscopio electrónico de barrido sea conductor, es decir, esté metalizado. Un enfriamiento enérgico del material permite, *in situ*, observar, sin tener que metalizar, a condición de que regulemos el valor de los electrones emitidos de manera que estén muy próximos al valor de los electrones incidentes, a fin de evitar la acumulación de cargas. Efectivamente, las muestras biológicas no son conductoras, y todo gira alrededor de este hecho, dado que al no serlo no pueden emitir las cargas.

Cuando un átomo es estimulado por los electrones incidentes, un electrón de las capas medianas es expulsado de su nivel para ocupar una órbita superior. Su pérdida de excitación se hace por emisión, bien sea de una fluorescencia de rayos X, o por electrones Auger, arrancados

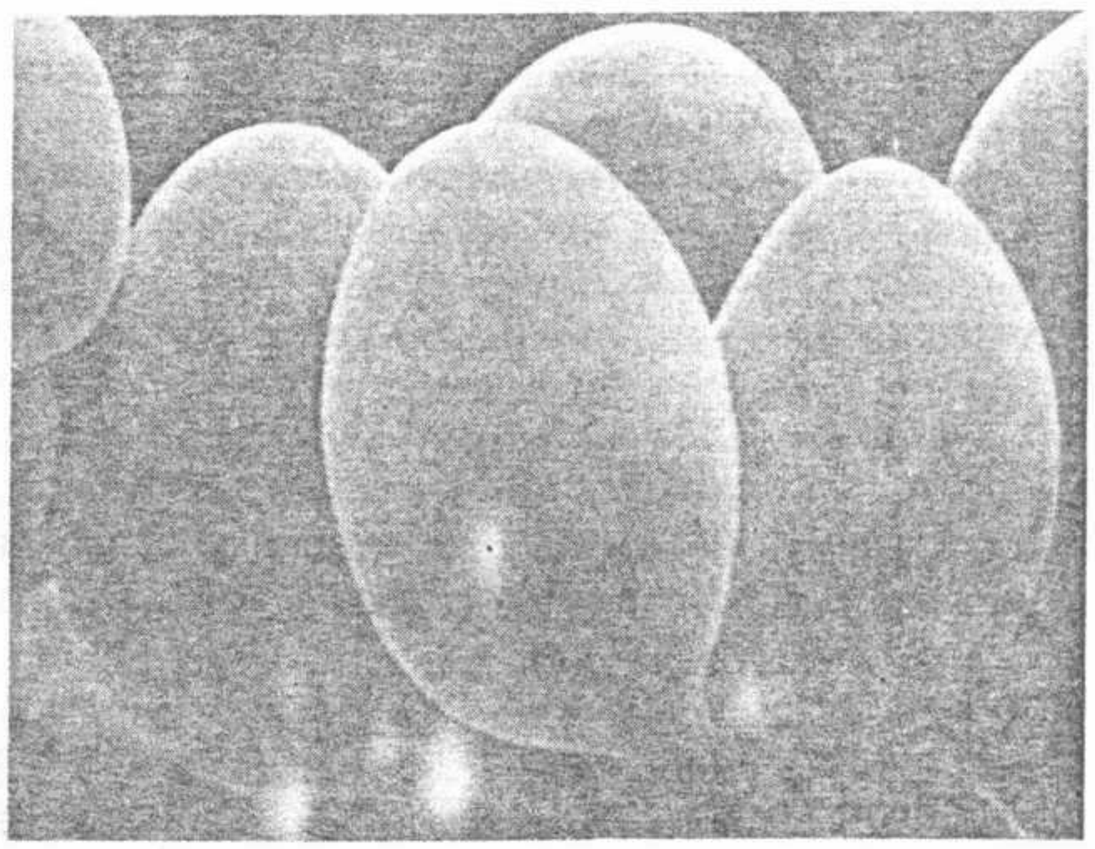


FIG. 107. — *Tétrada de basidosporos de* Chlorophyllum molybdites *(May. ex Fries) Mas. al microscopio electrónico de barrido.* Obsérvese cómo a estos aumentos tan elevados, unos 3000, se tiene una gran profundidad de campo y un perfecto relieve. Cliché del laboratorio de Geología, documento Jacqueline Perreau, Laboratorio de Criptogamia, Museo Nacional de Historia Natural, París.

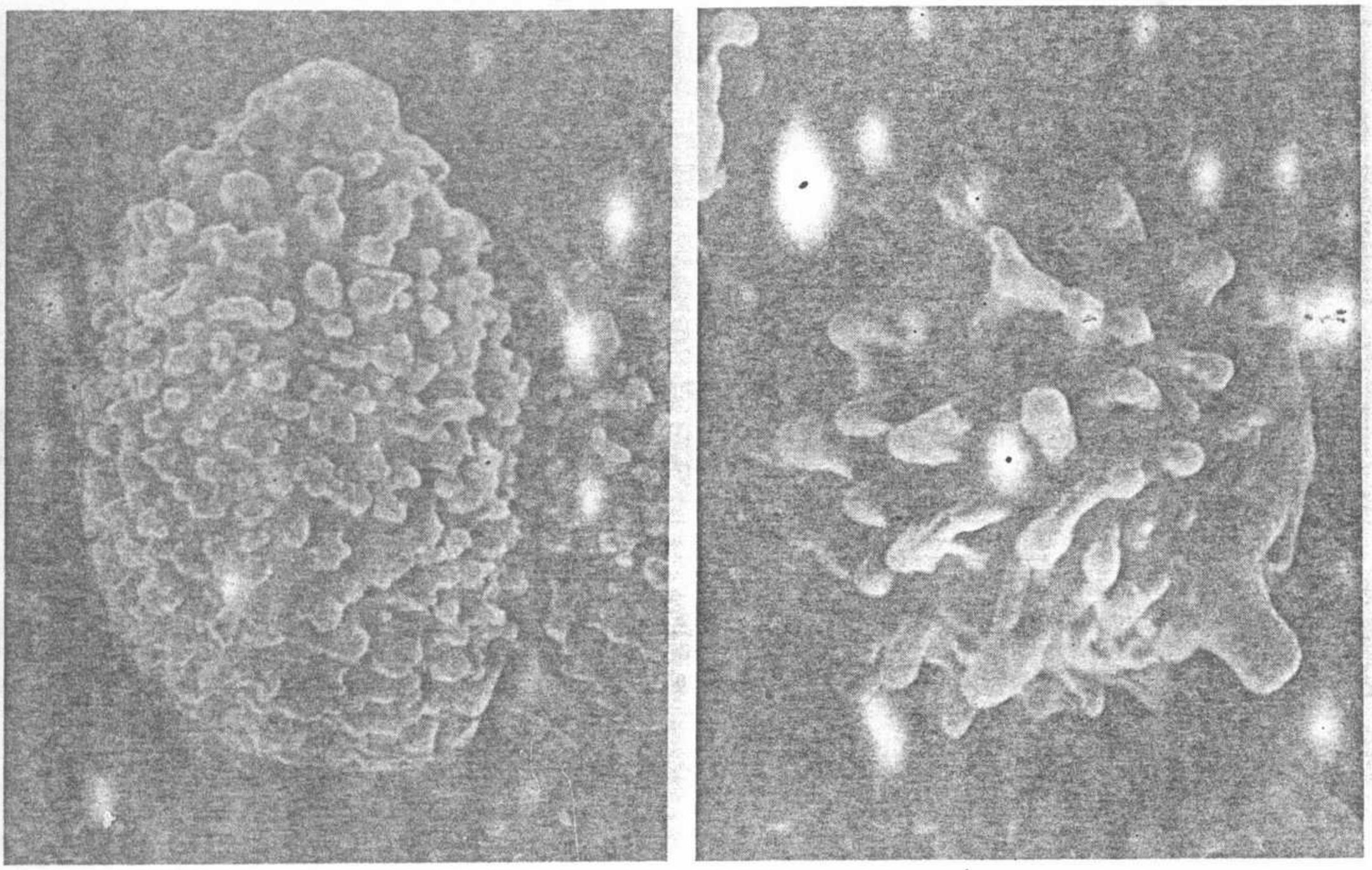


FIG. 108. — *Basidosporos* de Rozites caperata *(Pers. ex Fr.) Karst. a la izquierda y de* Russula clariana *Heim a derecha: unos 5000 aumentos.* Cliché del Laboratorio de Geología, documento de Jacqueline Perreau, Laboratorio de Criptogamia, Museo Nacional de Historia Natural, París.

de la capa superficial. La producción de rayos X es en este caso más probable que en el caso de los elementos pesados y la de los electrones Auger en el caso contrario. Estos dos tipos de radiaciones son característicos de los átomos que las producen.

La detección de rayos X puede hacerse por dos métodos: espectrometrías dispersivas en longitud de onda y en energía. Del berilio al uranio se utilizará para el análisis elemental una imagen de rayos X y de Auger o bien un espectro de rayos X y de Auger; algunos aparatos ofrecen la posibilidad de superposición de una imagen y de una línea espectral de análisis, lo cual facilita las interpretaciones.

Citemos, sin detallar, algunas de las posibilidades: la obtención de diagramas de difracción, el estudio de fluorescencias y el estudio de contrastes de potencial.

La mayoría de los aparatos pueden ofrecer diversas versiones, de la más sencilla, que permite el estudio morfológico mediante los electrones secundarios, hacia la versión mediana que da una idea global de la composición de las muestras, gracias a los electrones retrodifusados y finalmente la versión más completa y sofisticada, que permite el análisis elemental por los rayos X y los electrones de Auger, y finalmente hacia versiones muy completas, útiles en un laboratorio de física.

Montaje de las muestras. — Se hace sobre un portamuestras metálico generalmente de cobre, de 8 a 10 mm de diámetro. Una vez escogidas y orientadas en el espacio, a mano o con ayuda de un micromanipulador, las muestras son pegadas al portamuestras mediante un pegamento o con cinta adhesiva por las dos caras. Puede también depositarse una gota de una suspensión acuosa o alcohólica que contenga las muestras, y que quedarán espontáneamente adheridas tras la evaporación.

Metalización de las muestras. — Se deposita una capa de oro, de platino, de cobre, de germanio o de una aleación oro-paladio o de oro-cobre, que no llegue a sobrepasar los 100 Å. Esta metalización se efectúa directamente sobre la muestra, o tras un recubrimiento previo de carbón, en el caso de que se quiera preservar al máximo la forma, evitando las retracciones. El poder de resolución teórico, tras la metalización es de 200 Å a 80 Å (fig. 109).

Técnicas especiales. — Si se montan las muestras sobre un cubreobjetos, con ciertas precauciones, podrán observarse al microscopio óptico, antes y después de la metalización y examinarlas al microscopio electrónico de barrido, lo que permitirá una mejor observación y sobre todo facili-

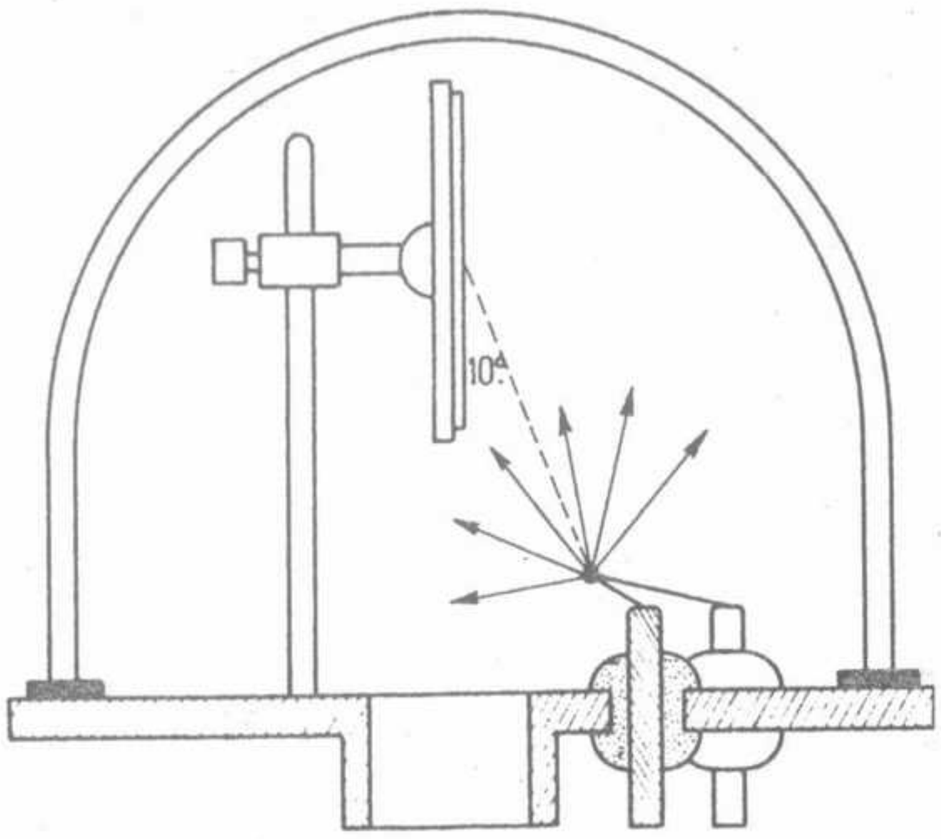


FIG. 109. — *Principio del sombreador y del metalizado con carbono.* Bajo una campana en la que hay un vacío elevado se evapora por incandescencia de un filamento del material escogido. Para el recubrimiento con carbono se hace saltar un arco entre dos electrodos de grafito; en este último caso el objeto está siempre situado perpendicularmente al arco.

tará la interpretación de las estructuras observadas: Aubry (1973).

Antes de la metalización puede someterse la muestra a las técnicas de criofractura selectivas iniciadas por Locquin (1942) en microscopia fotónica. Superficies pulidas y cubreobjetos delgados son igualmente utilizables.

Fractura de rocas que contengan microfósiles. Con el microscopio electrónico de barrido pueden observarse *in situ* los microfósiles, fracturando previamente la roca sedimentaria que los contiene. Esporas, granos de polen, acritarcos son bien visibles, dado que generalmente se hallan libres en el seno de las rocas, a nivel de lo que Locquin denomina una «morfónica». Es el hecho de estar conservados en la roca en estado de materia orgánica que asegura su desprendimiento espontáneo de la roca (Locquin, 1977, 1978).

Trituración y flotación diferencial. — La roca es reducida a polvo y colocada en suspensión en agua. Una corriente de agua canalizada por un tubo de vidrio afilado provoca burbujas que arrastran en superficie las estructuras más ligeras. Los microfósiles conservados en estado de materia orgánica son de esta forma concentrados en las espumas y pueden sacarse fácilmente con un cubreobjetos. Eventualmente podemos hacer una separación por densidades crecientes añadiendo agentes tensoactivos (Locquin, 1978, 1979, 1980).

Inconvenientes y limitaciones. — Los principales inconvenientes son:

— la necesidad de tener que trabajar en el vacío:

— la observación con luz reflejada por la superficie, sin que haya penetrado;

— la imposibilidad de efectuar una tinción o impregnación diferencial;

— la sensibilidad a las impurezas, a los residuos de las manipulaciones anteriores;

— la dificultad de la eliminación de disolventes, fijadores o conservadores;

— la necesidad de una deshidratación que no provoque deformaciones o de una crio-observación;

— la fragilidad de determinados objetos, el hecho de ser quebradizos;

— la carbonización de algunas muestras frágiles;

— la dificultad de eliminar la capa de metalización con agua regia, para recuperar las muestras.

Las limitaciones están unidas al poder de resolución y a la gran diferencia existente entre este instrumento y el microscopio electrónico de transmisión.

Desmetalización. — Únicamente puede llevarse a cabo cuando las muestras están montadas sobre un cubreobjetos o portaobjetos y pegadas. A continuación, indicamos la técnica ideada e utilizada por J. Taugourdeau, G. Lachkar, E. Masure y J. C. Audran (1973): el cubreobjetos tras su observación se despega del portamuestras mediante una cuchilla y se deposita sobre un vidrio de reloj. Se añaden 2 o 3 gotas de agua regia. En menos de 2 minutos la transparencia del cubreobjetos indica cuándo termina el desmineralizado. Se añade 1 ml de agua destilada, se traslada a un segundo vidrio de reloj que contenga agua destilada. La película de cola se vuelve opaca en el transcurso de estos lavados. Se coloca a la estufa a 60° y se vuelve transparente. Se monta entre porta y cubreobjetos en un líquido hidrófilo. No debe pasarse nunca al alcohol dado que éste opacifica.

Pegamentos. — Leffingwell y Hodgkin (1971) recomiendan un cloruro de polivinilo soluble en el etil-metil-acetona diluido hasta alcanzar una consistencia de jarabe. Debe esperarse que la evaporación superficial endurezca un poco la gota depositada y extendida sobre el soporte y colocar las muestras que se adhieren bajo una débil presión. El cubreobjetos está unido al soporte de cobre con una solución de sales de plata.

Microdisecadores. — Atendiendo al tamaño de las muestras se escogerá: un microdisecador con reducción por pantógrafo, un microdisecador a reducción dinámica para bloques viscosos o bien un microdisecador fijado al objetivo del microscopio.

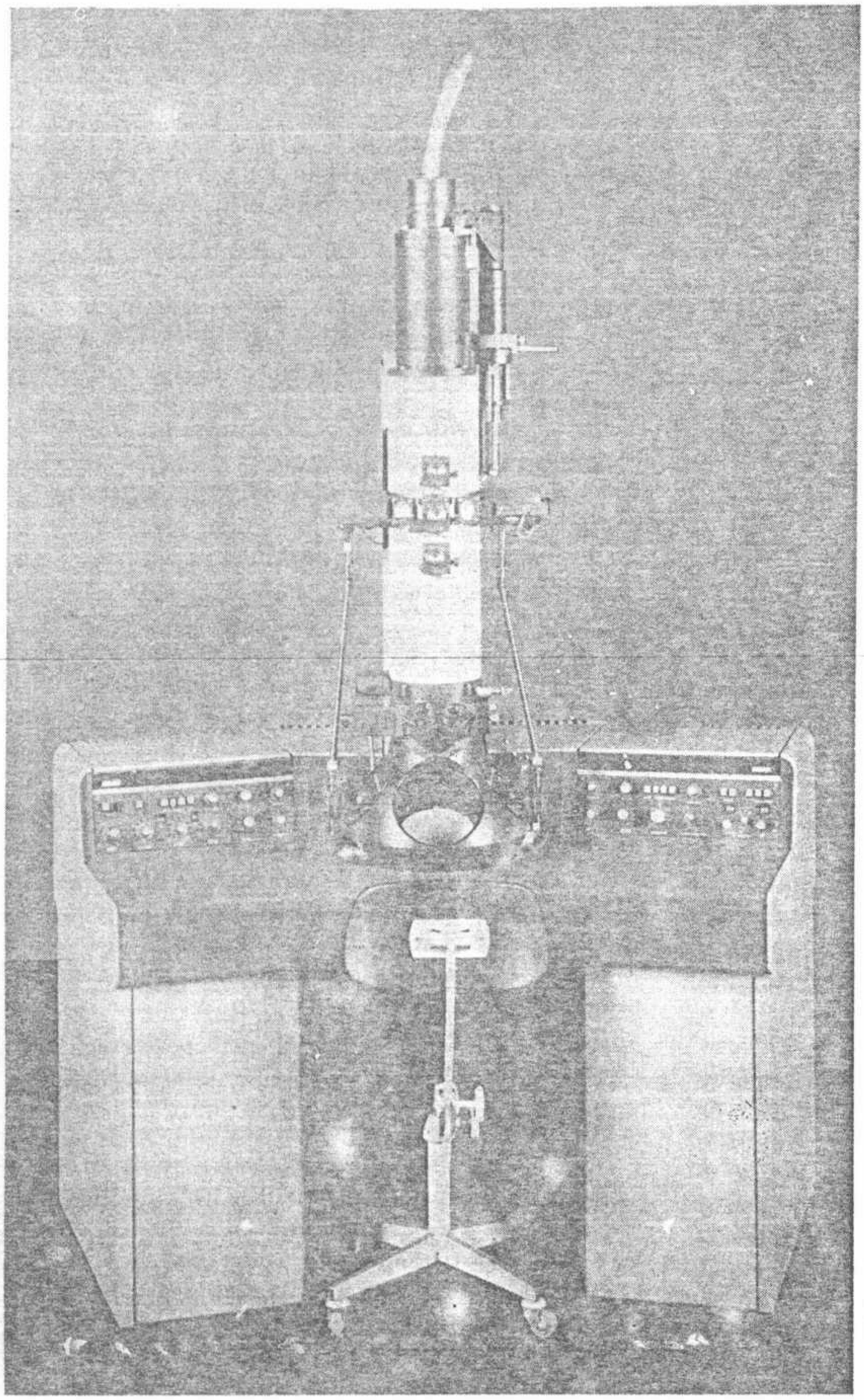


FIG. 110. — *Microscopio electrónico de transmisión Philips.* Documento Philips Eindhoven.

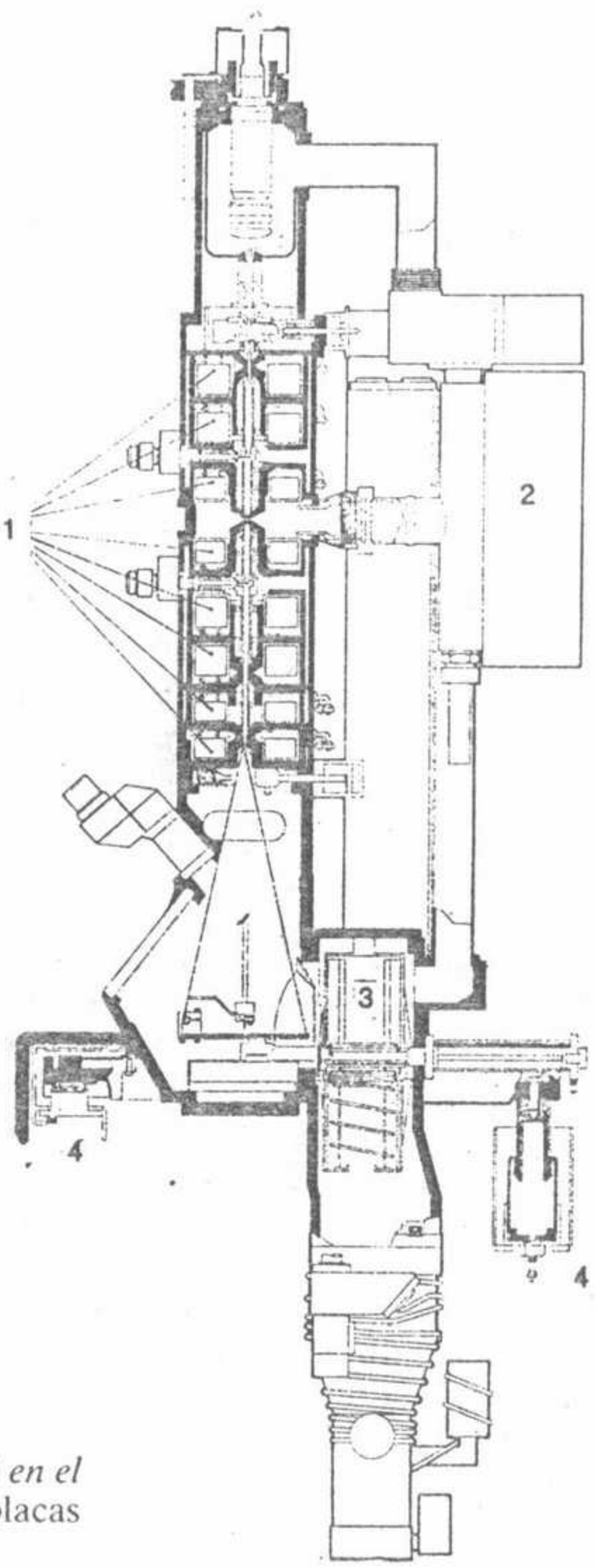


FIG. 111. — *Sección de una columna del microscopio electrónico Philips EM 400 en el que se puede observar:* 1, las siete lentes; 2, la bomba iónica; 3, la cámara de placas fotográficas; 4, el conjunto antivibratorio. Documento Philips Eindhoven.

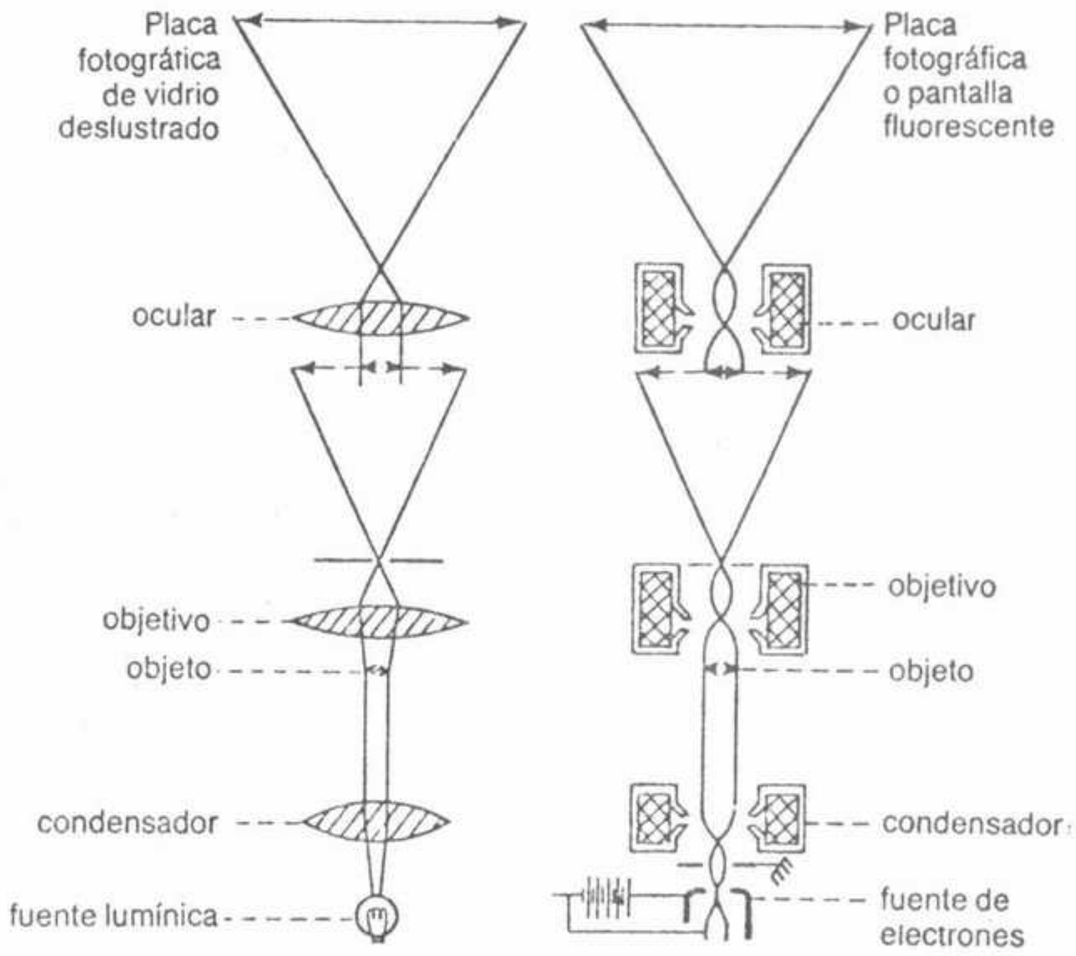


FIG. 112. — *Esquema comparativo de la trayectoria de los rayos en un miscroscopio fotónico a la izquierda y electrónico a la derecha.* En la práctica, la mayoría de los microscopios electrónicos están dispuestos como un microscopio fotónico invertido.

EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

Es la prolongación, todavía más lejos hacia lo infinitamente pequeño, del microscopio fotónico por transmisión, es decir, de fondo claro.

Su desarrollo nació de la necesidad de analizar cada vez más los más diminutos detalles de las estructuras biológicas, por debajo del poder de resolución unido directamente a la longitud de onda del flujo iluminador. El poder de resolución del microscopio fotónico en la práctica no desciende por debajo de las 0,2 μm, mientras que el microscopio permite una resolución del orden casi mil veces por debajo de este valor.

Esta ventaja, obtenida tras laboriosas investigaciones, condujo al diseño de un instrumento complejo, costoso y cuyo principal inconveniente, desde el punto de vista biológico, es la necesidad de trabajar en un vacío potente sobre objetos extremadamente delgados. A pesar de esta limitación, se puede decir que el microscopio electrónico al cabo de 50 años ha aportado más detalles

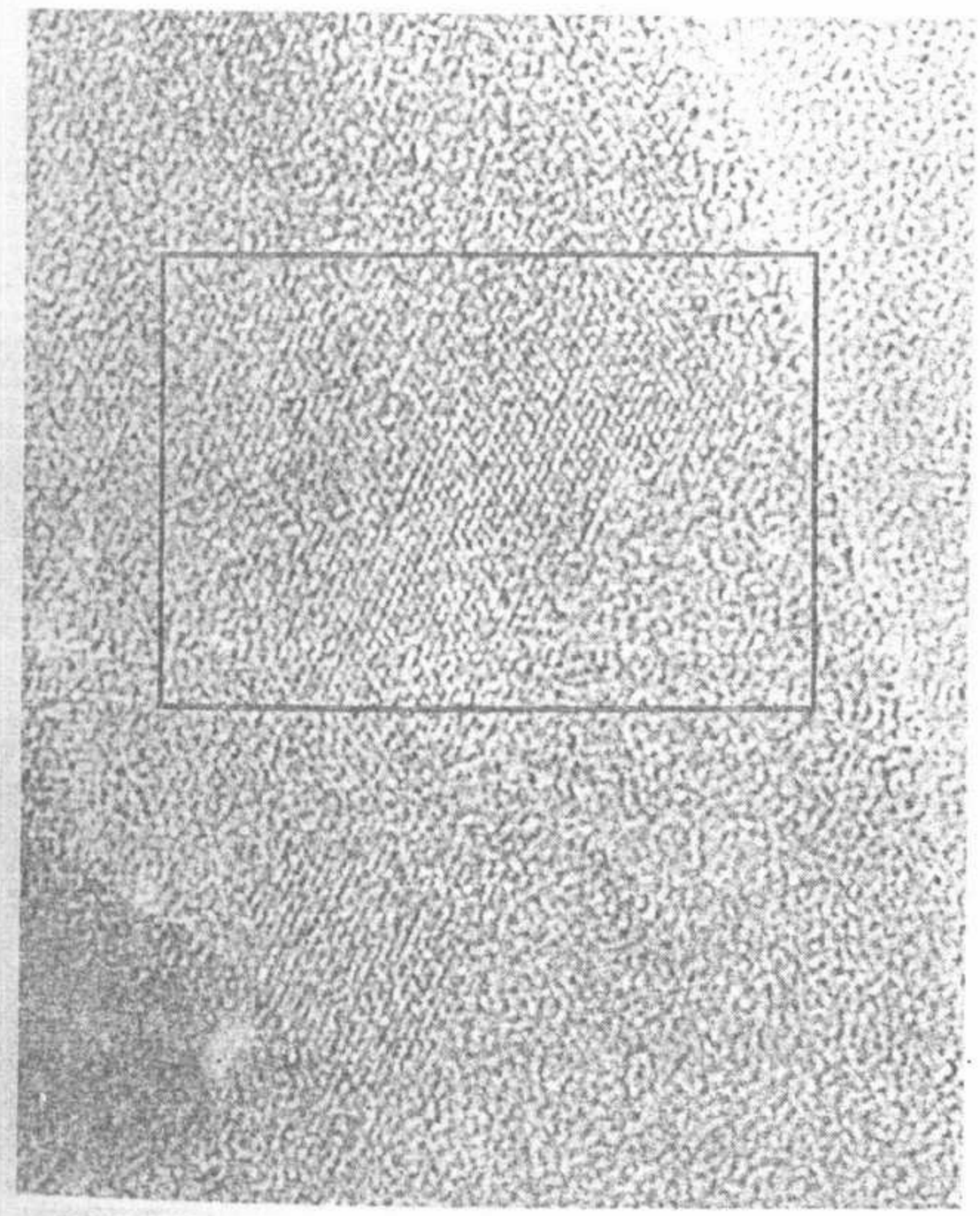


FIG. 113. — *Imagen de una muestra frágil de caolín observada a 120 Kv y a 2 150 000 aumentos.* En el encuadrado se observa la distribución de los planos reticulares siguiendo las tres direcciones de 120° con un intervalo de 4,5 Å. Documento Philips.

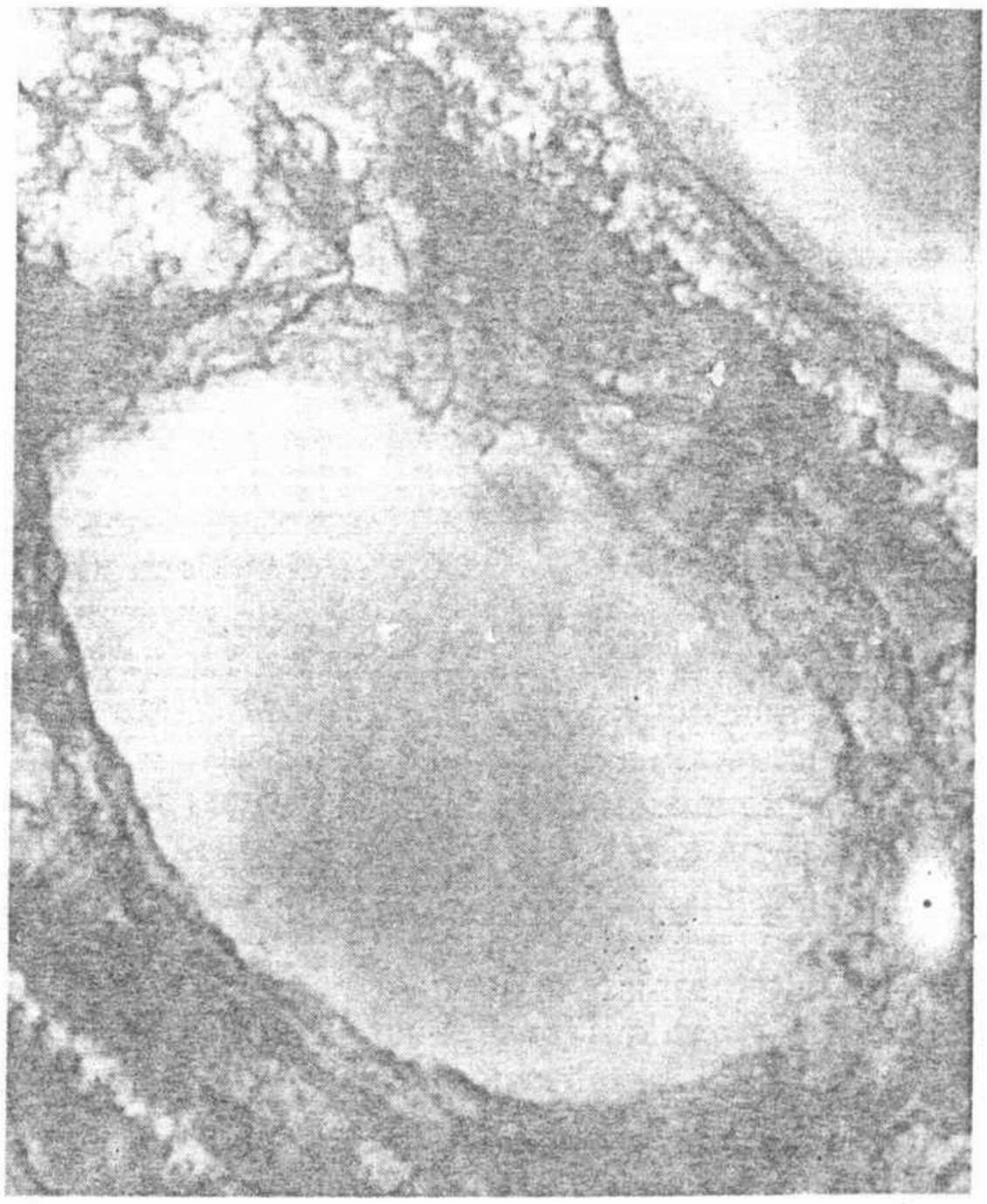


FIG. 114. — *Al atravesar una preparación de 2 micrómetros de grosor a 120 Kv, gracias al filtro de velocidades hay una excelente compensación de pérdidas de energía. Raíz de ricino con tratado selectivo.* Preparación de N. Poux, N. Carasso y P. Favard, Laboratorio de Botánica, Escuela Normal Superior de París. Documento Philips.

del conocimiento íntimo de la célula y de los tejidos que los estudios aportados por el microscopio fotónico en dos siglos (fig. 110).

La figura 111 representa, en corte esquemático, un «microscopio electrónico por transmisión», abreviado MET o TEM *(Transmission Electron Microscope)*. La disposición generalmente adoptada es la inversa de la del microscopio de transmisión: la fuente de electrones está en la parte superior de una columna, portadora de: un condensador del haz en uno o dos niveles, la muestra, un objetivo, una lente proyectora intermediaria, una lente proyectora final (homóloga al ocular del microscopio fotónico), una pantalla fluorescente sobre la que se forma la imagen, un dispositivo de registro fotográfico de la película. Diversos accesorios pueden incorporarse: un estigmatizador que permita corregir los defectos del astigmatismo del objetivo, un portaobjetos de 4 grados de libertad, etc. Un sistema de bombeo que mantiene un vacío elevado en la columna. Un compartimento estanco donde se introduce la muestra sin que se pierda el vacío de la columna (fig. 112).

Algunos microscopios electrónicos están equipados del contraste de fases marginal derivado de la técnica de Heine en microscopia óptica, adaptado al microscopio electrónico por Locquin (1956).

Para preparar las muestras se recurre a determinado tipo de técnicas particulares que han sido ampliamente descritas en los tratados especializados que figuran en la bibliografía. Mencionaremos a título de ejemplo los ultramicrótomos que permite hacer cortes ultrafinos de muestras incluidas en resinas plásticas mediante cuchillas de vidrio o de diamante.

Metalización al vacío. — Es una técnica que ha sido desarrollada para la microscopia electrónica principalmente. Bessis y Locquin demostraron su interés para la microscopia fotónica. La mayoría de los microscopios electrónicos de barrido únicamente admiten muestras metalizadas.

Durante mucho tiempo estos aparatos han sido dispositivos autónomos y voluminosos. Actualmente, están en ocasiones incorporados al microscopio, o concebidos como subplatina del microscopio fotónico, lo que permite la observación al microscopio durante la metalización.

Cuando la metalización se hace oblicuamente se denomina sombreado por el hecho de que la imagen que resulta posee una determinada «sombra negativa» por uno de los lados de la muestra. Los objetos metalizados de esta forma pueden ser observados en fondo claro, en contraste de fases, en contraste interferencial por transmisión o por reflexión (fig. 115).

El mismo equipo posibilita la obtención de réplicas previo depósito de una capa delgada y transparente a los electrones tras la disolución del objeto. Estas técnicas son estudiadas en tratados especializados en la parte correspondiente a las técnicas de microscopia electrónica.

Lo mismo ocurre en el caso de la catodoluminiscencia que puede efectuarse con este aparato en el caso de que esté provisto de un cañón de electrones.

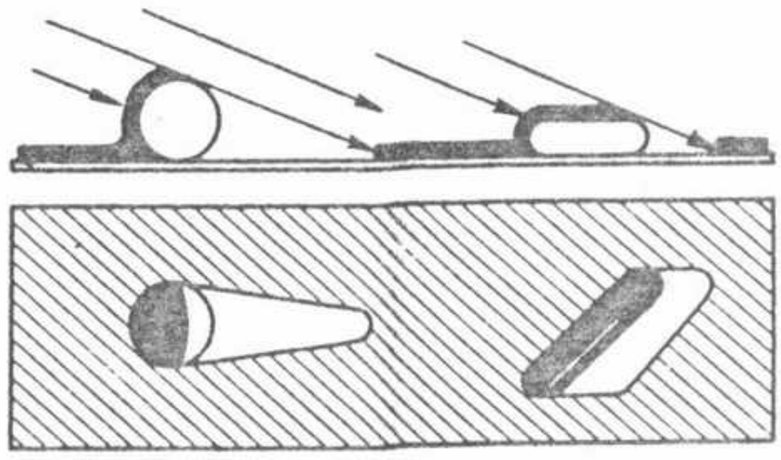


FIG. 115. — *Trayectoria seguida por los átomos en el proceso del sombreado y su resultado.* Según Policard, Bessis y Locquin.

Sombreado con carbón. — Antes de la aparición del microscopio electrónico de barrido, la técnica del sombreado de muestras gruesas y aisladas por una delgada capa de carbono, producida por un arco situado entre dos electrodos que funcionan en el vacío ha tenido un gran éxito. Todavía es aconsejable su utilización en el caso de muestras esféricas, dado que tras la disolución del objeto queda una «concha», auténtico molde tridimensional de la muestra, que permite una buena representación de su volumen y de su relieve mientras que el MEB únicamente explora la superficie de una de las caras del objeto. El objeto moldeado de esta forma es observable, tanto en el microscopio fotónico como al microscopio electrónico, gracias a la fuerte absorción del carbón, incluso cuando se forman capas delgadas (fig. 109).

Réplicas y fracturas. — Estas técnicas tienen un gran interés en microscopia electrónica, sin embargo todas ellas fueron diseñadas para ser observadas con el microscopio óptico, dando interesante información.

Consideremos, por ejemplo, la observación de un hongo parásito en la superficie de una hoja. Indudablemente puede obtenerse un corte transversal de la hoja, a fin de examinar su estructura y la implantación del parásito. Para la observación rápida es preferible «calcar» las estructuras superficiales de la siguiente forma: untando la superficie foliar con colodión diluido y tras su secado se arranca la película superficial, utilizando para ello una cinta adhesiva transparente, con lo cual podrán desprenderse los parásitos. Esta misma técnica es aplicable al estudio de revestimientos como el de los hongos, en este caso la

réplica arranca la capa de células superficiales y permite el estudio de células aisladas, respetando sus respectivas posiciones en los tejidos.

Una variante de la réplica es la huella. En lugar de intentar sacar células superficiales se coge la huella de una estructura superficial arrancándola. En este caso el untado con la solución diluida de colodión únicamente sirve para transferir el perfil de la superficie entre porta y cubreobjetos, tras un eventual metalizado oblicuo intermediario para hacer destacar los relieves.

Estos dos métodos permiten sólo el estudio de estructuras superficiales, las fracturas permiten el estudio de las capas profundas. La forma más sencilla y rápida de proceder consiste en congelar para dar consistencia a la muestra y provocar seguidamente una fractura mediante una cuña, cuchilla, a fin de que las líneas de menor resistencia mecánica provoquen desprendimientos entre las estructuras más o menos profundas de la muestra, que se diferencian en la superficie de la fractura a modo de hoquedad o en relieve.

(Para los detalles de procedimiento, remitimos al lector a obras especializadas en microscopia electrónica.)

Moldeado. — Puede obtenerse información sobre el relieve y la superficie de las células tomando un molde de su superficie, que deberá ser suficientemente delgado para ser observado (Claude, 1949). El sombreado permitirá eventualmente reforzar los relieves. Existen diversos métodos de moldeado desarrollados en función de la muestra a estudiar.

El principio del método es el siguiente. Se recubre el portaobjetos sobre el cual hay una extensión con una película plástica sobre la que se imprimen todos los relieves de la preparación y lo que se observa al microscopio electrónico en esta película. Pueden observarse directamente o bien tras efectuar un sombreado previo. Una variante más sencilla y que da imágenes más fiables consiste en sombrear la preparación antes de sacar la réplica y trasladar la sombra, película de oro, con la materia plástica; las células, demasiado gruesas, quedan eliminadas (réplica premetalizado).

En este caso no se trata de auténticas réplicas sino de células sombreadas, de las que únicamente observamos la sombra. Cuando la metalización se hace previamente a cualquier otra preparación este método es el más fidedigno de lo que puedan idearse para estudiar la superficie de las células desecadas.

Las preparaciones así obtenidas ofrecen al microscopio electrónico imágenes de células de extensiones, exactamente superpuestas a las que se observan al microscopio fotónico tras su sombreado.

Describiremos a continuación dos técnicas aplicables a las células aisladas.

a) **Moldeado presombreado.** — La operación consiste en sombrear las células sobre el portaobjetos, siguiendo el método habitual y en recoger seguidamente esta sombra con la ayuda de una membrana plástica.

Seguidamente especificamos los pasos a efectuar. Las extensiones son metalizadas con oro, de la forma habitual; seguidamente se sumergen en una solución de formvar al 0,5 % en cloroformo, se sacan rápidamente de dicha solución y se dejan secar en posición vertical. Con una aguja se traza una línea que siga los bordes del portaobjetos de manera que cortamos la película de formvar en fragmentos del tamaño de las rejillas que se procesan para su observación al microscopio electrónico. Estos fragmentos se desprenden del portaobjetos al sumergirlo en un cristalizador lleno de agua, sobre cuya superficie se irán disponiendo los fragmentos, arrastrando con ellos la cara de oro del metalizado y las células que deberán eliminarse, lo cual puede hacerse por una digestión.

Los fragmentos de membrana son transferidos a una solución de tripsina al 2 % en agua destilada a la que hemos añadido unas gotas de sosa normal. La solución debe filtrarse antes de usar.

Si se trabaja a la estufa a 37° la digestión tiene lugar en una media hora. Recuperados los fragmentos, lavados en dos baños sucesivos de agua destilada y montados sobre las rejillas. Para la digestión de las células pueden utilizarse otros enzimas o diversos productos químicos, la solución indicada es la que ofrece mejores resultados a la vez que con mayor rapidez.

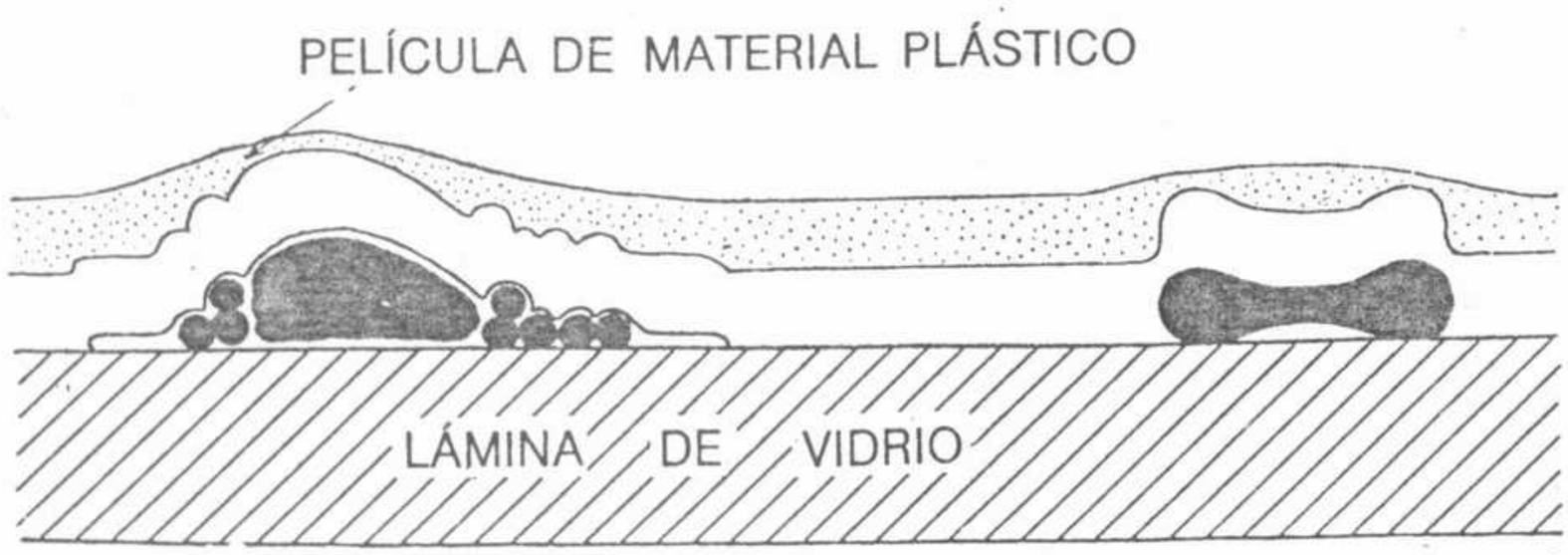


FIG. 116. — *Esquema de un corte de células sanguíneas recubiertas por una película de material plástico, en el momento en que ésta se desprende.* Según Policard, Bessis y Locquin.

Las células han tenido que ser previamente fijadas con una solución que no interfiera con la digestión enzimática que posteriormente se aplicará. Si se utilizara el tetraóxido de osmio se evitará contrastar las células, de lo contrario la digestión quedaría sensiblemente dificultada.

La membrana obtenida de esta forma es sensiblemente más gruesa que las que se utilizan como soporte de los cortes, lo cual facilita extraordinariamente la observación del relieve celular.

b) **Empleo de una capa intermedia de separación.** — En el caso de que no pueda eliminarse la célula por digestión puede utilizarse una capa de separación (Bricka y Tabuis, 1950).

1.° Se aplica sobre la preparación una capa uniforme de metal —por ejemplo, de aluminio— por metalización en el vacío, con una incidencia normal.

2.° La preparación es seguidamente metalizada con oro siguiendo la técnica clásica (en el caso de desear una réplica presombreada).

3.° Por inmersión en una solución de formvar al 0,5 % en cloroformo se cubre el conjunto con una película de grosor adecuado.

4.° Esta membrana será cuadriculada con la punta de una aguja enmangada, de manera que se obtengan fragmentos de pequeñas dimensiones; seguidamente, se introduce el portaobjetos suavemente en ácido fluorhídrico o clorhídrico diluido para debilitar el ataque del aluminio, procurando que la película de formvar se desprenda y flote en la superficie, sostenida por burbujas de gas que se van desprendiendo.

5.° Se recogen estas películas a fin de montarlas, tras su paso por agua destilada. Este sistema desprende las células sin destruirlas y permite obtener la imagen de una célula y de su molde. El metal generalmente utilizado es el aluminio, aunque presente una estructura granular bastante acentuada. Esta técnica es menos fiel que la de la réplica presombreada, dado que el sombreado se ha hecho por encima de la capa intermediaria que atenúa los relieves y enmascara los detalles más delicados.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE ALTO VOLTAJE

Los instrumentos puestos a punto en Toulouse principalmente por G. Dupouy y colabs., se basan en la utilización de un elevado voltaje para atravesar las muestras. Desgraciadamente, no son instrumentos muy frecuentes. Los resultados obtenidos con ellos en biología hacen que lamentemos que su uso no sea más generalizado. Un instrumento de estas características, en manos de un biólogo permitiría indudablemente grandes hallazgos.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE EXCITACIÓN ULTRAVIOLETA

Después de los estudios de Gauzit se sabe que los fotones de U.V. pueden arrancar electrones de las muestras y la imagen se forma a partir de dichos electrones. Los resultados obtenidos resultan interesantes. El aparato fue diseñado por la casa Balzers.

MICROSCOPIO PROTÓNICO

C. Magnan, sustituyendo los electrones por protones e invirtiendo las polaridades del sistema electrostático, logra focalizarlos y ha podido transformar un microscopio electrónico en un microscopio protónico. Si sabemos que las ondas asociadas a los protones son incomparablemente más pequeñas que las ondas asociadas a los electrones, hemos deducido que el poder de resolución teórico de un microscopio de estas características debe sobrepasar en mucho al del microscopio electrónico, pero una causa esencial limita, hoy por hoy, la utilización práctica de este modelo de microscopio.

La masa de protones utilizada es incomparablemente más grande que la de electrones y su efecto destructor sobre la muestra es mucho más intenso. Por otro lado, el poder de resolución es inversamente proporcional a la masa de las partículas; hasta el presente no se conocen objetos biológicos que sean suficientemente transparentes a los protones para que podamos obtener imágenes interesantes. Pero no debemos predecir el futuro, cuando se dominen mejor las técnicas del microscopio protónico es posible que éste complemente de forma interesante la microscopia electrónica.

MICROSCOPIO IÓNICO

Sustituyendo iones por electrones pueden construirse microscopios iónicos que tienen como principal interés posibilitar la observación de superficies llevadas a elevadas temperaturas y como consecuencia emisoras de iones.

No encontraremos en detalles sobre estos instrumentos, para mayor información remitimos al lector al artículo de Gauzit.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

El efecto Raman se produce por la excitación de determinadas moléculas al ser bombardeadas por una potente fuente de fotones. Si las moléculas observadas no son fluorescentes o si esperamos el tiempo suficiente para que la fluorescencia

se apague, podremos observar una débil radiación difusa, denominada «difusión Raman» del nombre de quien lo descubrió. Debemos ser cuidadosos al escoger para la excitación una longitud de onda que no tenga efecto catalítico sobre las moléculas observadas. En el espectro de difusión, además de un pico central correspondiente a la longitud de onda monocromática excitadora, hay numerosas y débiles bandas simétricas. Es la diferencia existente entre la longitud de onda excitadora y la de una banda emitida, característica de las moléculas. El instrumento está acoplado a un microscopio que permite una resolución del orden de la micra (Jobin-Yvon).

MICROESPECTROSCOPIA RAMAN LÁSER

La utilización del efecto Raman en microscopia fue iniciada en la Universidad de Lille en Francia. El aparato comercial fue construido por Jobin-Yvon. En su principio, el aparato es similar a la sonda electrónica de Castaing, o a la microsonda electrónica de Slodzian. Un haz de fotones producido por el láser ilumina puntualmente la muestra. La difusión Raman es analizada por un espectrógrafo y permite la identificación y la localización detallada de estructuras poliatómicas. Puede procederse de dos maneras, o bien registrando el espectro Raman de un punto objeto o bien formando una imagen caracterizada por una longitud de onda asociada a una estructura específicamente buscada. El método encuentra sus límites en la débil intensidad de las bandas Raman que necesitan una hora para registrar un espectro. Esta desventaja es compensada por el valor inestimable de las informaciones que es imposible obtener por otros sistemas. Con este sistema Locquin y Boyer pudieron demostrar la naturaleza calcárea de los esferoides de menos de 1 μm de diámetro y que otros autores han podido analizar la composición de las inclusiones líquidas o gaseosas en los cristales naturales: cuarzo, esmeralda, diamante.

MICROANALIZADOR IÓNICO

El primer aparato fue diseñado por Slodzian. Analiza los iones secundarios emitidos por la muestra bajo el impacto de un haz de iones. Los constituyentes de la muestra son identificados por espectrografía de masa. Puede formarse la imagen de un constituyente particular, o bien registrar el espectro de masa completo de un punto particular. Los límites del instrumento son debidos al hecho de que varios iones secundarios pueden tener la misma masa y porque el bombardeo iónico altere progresivamente la muestra, lo que en ocasiones puede resultar útil para el análisis progresivo de la muestra. El aparato puede utilizarse para localizar con máxima precisión los átomos ligeros como los alcalinos, presentes en las muestras biológicas, Venc-Peyré, 1979.

EMISIÓN IÓNICA SECUNDARIA

La muestra es bombardeada por iones primarios que arrancan determinados átomos o grupos de átomos, estando algunos ionizados; son analizados por espectrometría de masa. El instrumento posee una óptica iónica que filtra los iones y puede formar una imagen de un determinado ion.

Este instrumento es comparable al anteriormente descrito, pero la imagen en este caso se forma por barrido de un haz de iones de argón o de oxígeno. Podemos usar iones negativos o positivos invirtiendo la polaridad óptica. Un análisis cualitativo es difícil, por el hecho de que los iones secundarios pueden llevar una o varias cargas elementales y de esta forma interferir en los resultados. Podemos efectuar un análisis cuantitativo únicamente sobre muestras extraordinariamente planas.

Al igual que en el caso del microanalizador iónico debemos disipar las cargas a nivel de la muestra, haciéndola conductora por depositarla sobre una rejilla metálica. El objeto se observa a través de los agujeros de la trama.

MICROSONDA NUCLEAR

Puede utilizarse un acelerador de partículas para producir un haz de iones de pequeño diámetro (Pierce, 1975). Un haz intenso de 3 μm de diámetro puede inducir una reacción nuclear en numerosos elementos de escaso peso atómico, como son el carbono, el nitrógeno y el oxígeno, difícilmente accesibles por otros métodos. Esto determina una difusión elástica y la emisión de rayos X. El método muestra la distribución de los isótopos de nitrógeno o de oxígeno, por ejemplo.

La energía transferida a las moléculas de la muestra es suficiente como para estimular ciertas reacciones químicas específicas, lo cual no puede conseguirse por otros sistemas. Es un método que tiene mucho futuro, para desarrollar un nuevo aspecto de la citoquímica.

PIRÓLISIS POR ESPECTROGRAFÍA DE MASA

El aparato Lamma láser utilizado por Leibdt y Mathey (1978, 1979) permite volatilizar un mi-

crocristal *in situ* del talo de un liquen y analizar por espectrografía de masa en un aparato acoplado al microscopio. Es el método escogido para poder comprender la quimiotaxonomía a nivel celular, permitiendo así caracterizar pigmentos tales como las xantófilas, los ácidos nucleicos, los polisacáridos, los aminoazúcares, fosfolípidos, lípidos y aminas (Weijman, 1977).

XII. — MICRODETERMINACIONES FÍSICAS

MICRODETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

Debemos pensar que ni siquiera los físicos han logrado dar todavía la definición totalmente satisfactoria de lo que es la *presión osmótica*. Efectivamente, H. C. Eyster desea una estandarización del término *presión osmótica* y propone la siguiente definición: «La presión osmótica es la presión de difusión de las moléculas de agua al intentar atravesar una membrana».

Método microscópico de G. Barger (1904). — Es realmente difícil hallar en las obras clásicas de fisicoquímica, un método verdaderamente sencillo y práctico de determinación de la presión osmótica, sobre todo cuando hay que trabajar con pequeñas cantidades de líquidos. R. Buller, en el volumen 6.° (1934) de su admirable *Researches on fungi*, indica el procedimiento de Barger, que empleó con éxito para sus experimentos sobre la presión osmótica del jugo celular de Piloboles (fig. 117).

EL PRINCIPIO DEL MÉTODO consiste en comparar la solución problema con una serie de modelos preparados con una sustancia de peso molecular conocido y que por consiguiente tienen una presión osmótica conocida. Para ello introducimos, en un tubo capilar, gotas de las dos soluciones, la conocida y la problemática. La tensión de vapor de las gotas que tienen la presión osmótica más baja es mayor que la de las gotas que tienen una presión osmótica más elevada; por consiguiente, el vapor de agua pasa de gotas de baja presión a las gotas de alta presión sobre las que se condensa, aumentando su longitud, mientras que la de las otras disminuye.

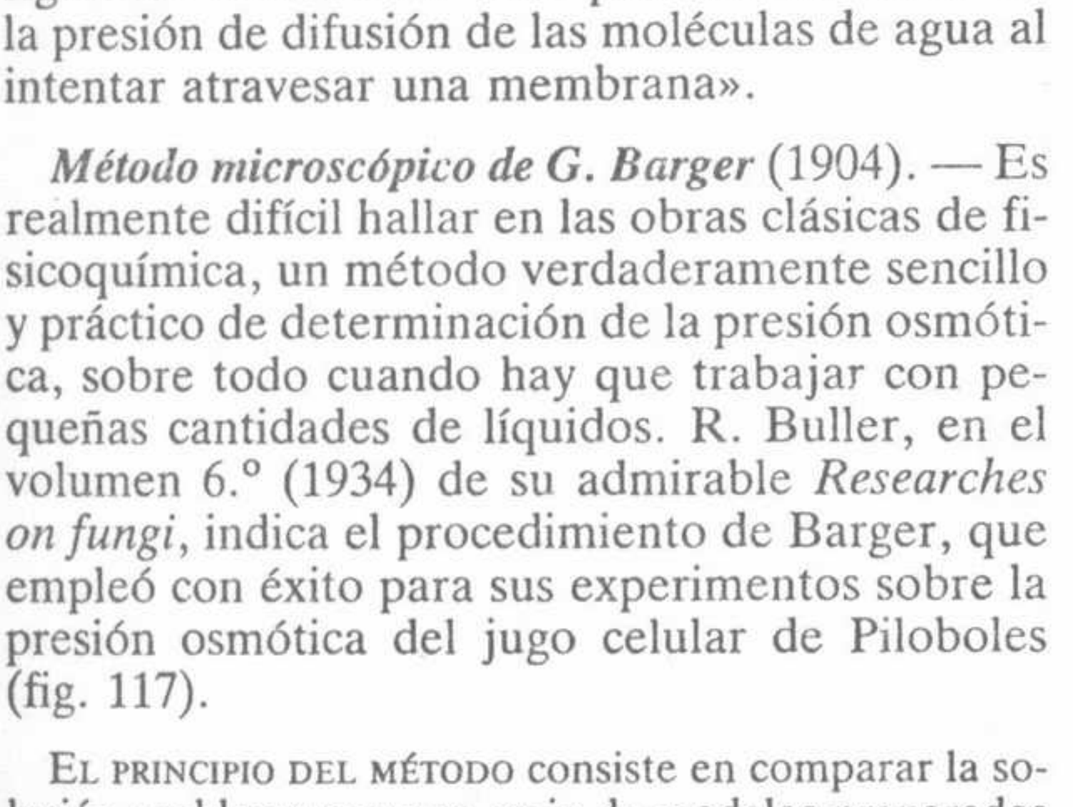


FIG. 117. — *Medida de la presión osmótica.* En la parte superior, tres tubos capilares, uno de ellos es portador de la gota patrón; abajo, medida de la posición de la gota a través de un ocular micrométrico.

Preparamos pues tubos capilares que midan de 6 a 8 centímetros de longitud y cuya luz tenga un diámetro de 1 milímetro. En cada tubo introducimos 7 gotas separadas por pequeñas burbujas de aire (fig. 117), o 4 gotas de la solución modelo y 3 gotas de la solución problema. Se cierran los tubos capilares por los dos extremos y se fijan sobre una lámina mediante cera de moldear o con betún de nogal. El conjunto se sumerge en una caja de Petri llena de agua.

Para hacer la determinación debe medirse automáticamente con el ocular micrométrico las longitudes de 5 gotas centrales, las más cortas (dos gotas de la solución modelo y 3 gotas de la solución problema). Debe repetirse la misma medición al cabo de treinta y seis horas.

■ SOLUCIONES CONTROL. — Buller utilizó soluciones de sacarosa. La solución madre contiene 34,2 g por 100 ml de agua destilada: se trata pues de una solución normal. Su presión osmótica es de unas 24 atmósferas a +20 °C, siguiendo la ecuación $P = \frac{RTg}{M}$, en la que P es la presión osmótica en atmósferas, R la constante gaseosa (0,082), T la temperatura absoluta (293 °C), g el número de gramos de azúcar por litro y M el peso molecular de la sacarosa.

A partir de la solución madre normal se prepara, por dilución, soluciones cuyas presiones osmóticas sean de 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 atmósferas.

LAS TÉCNICAS DE SEPARACIÓN DIFERENCIAL

Cuando distintos objetos están en suspensión en su líquido natural se puede obtener una prime-

ra separación por simple sedimentación. Esta sedimentación puede acelerarse por centrifugación. Esta centrifugación puede ser todavía más selectiva cuando se adoptan líquidos de densidades distintas, convenientemente superpuestas sin mezclas para concentrar determinados objetos a las interfases. Finalmente, haciendo una centrifugación más elevada a valores de G superiores es posible obtener una separación de los constituyentes intracelulares: se trata de la técnica de la ultracentrifugación.

Otro método: la *flotación diferencial de Dognon.* Añadiendo a la suspensión un agente tensoactivo y haciendo burbujear un gas en ella se concentran los objetos más delgados en las espumas.

ULTRACENTRIFUGACIÓN DE CÉLULAS

Las centrifugadoras de uso corriente no sobrepasan la velocidad de 6000 revoluciones por minuto, lo cual, con el diámetro habitual de los rotores, da una aceleración de 5000 veces la gravedad. Un reciente modelo de centrífuga, utilizando tubos inclinados da velocidades del orden de 18 000 revoluciones por minuto y una aceleración del orden de las 34 000 veces. Las ultracentrífugas, finalmente, giran a una velocidad de 100 000 revoluciones por minuto como mínimo; la fuerza conseguida está comprendida entre 100 000 y 500 000 veces la gravedad, con aparatos especiales pueden conseguirse hasta 8 millones la fuerza de la gravedad (Beams, 1942). La centrifugación a gran velocidad y la ultracentrifugación permiten, como veremos más adelante, separar y purificar gran número de estructuras celulares, tras homogeneización o digestión. En este apartado únicamente estudiaremos la ultracentrifugación de células vivas, que permite sedimentar diferentes elementos del interior de una célula, sin dañar su integridad. Esta técnica tiene un gran interés en citología general, así como en hematología, dado que permite estudiar la manera cómo se comportan los orgánulos durante su migración, su densidad relativa, la viscosidad del citoplasma, etcétera.

Técnica. — Se coloca en los tubos de la ultracentrífuga un fragmento de tejido hematopoyético o un líquido que contenga células. Es necesario que éstas se encuentren en un número abundante, de manera que llenen una cantidad considerable del tubo de centrífuga, tras la centrifugación; con ello se evita la deformación de la parte superior del tubo y únicamente se obtienen células dispuestas longitudinalmente, que se mantienen en esta posición por presión recíproca.

Cuando se dispone de poco material debe procederse de la siguiente manera: una gota de suspensión celular concentrada (por centrifugación ordinaria) es aspirada en un tubo capilar de plástico (polivinilo) adaptado a una aguja montada sobre una jeringa, este tubo, plegado por su parte central, se coloca en un alvéolo de la centrífuga previamente llenado de suero fisiológico o de otro medio isopicnótico, lo cual evita el estallido del tubo capilar. Tras la centrifugación se despliega el tubo, se observan por transparencia los límites de las diferentes capas y se corta con tijeras el sitio donde interesa hacer la extracción.

Una pequeña gota de emulsión es depositada sobre un portaobjetos para la observación en fresco (que debe ser inmediata); otras gotas se utilizarán para hacer la extensión.

Si se trabaja con un fragmento de tejido es aconsejable partirlo por la mitad paralelamente al sentido de la gravedad, uno de los trozos servirá para hacer aposiciones sobre el portaobjetos y será inmediatamente exprimido para obtener una gota de líquido que observaremos en fresco; la otra será fijada, incluida y cortada siguiendo una orientación adecuada.

El tiempo y la velocidad de centrifugación varían atendiendo a la naturaleza del material de estudio y el objetivo que se persigue.

DETERMINACIÓN DEL PESO SECO DE LOS COMPONENTES CELULARES

La microscopia interferencial, permite, *in situ*, determinar el peso seco, por mediación de la medida del índice de refracción de la muestra sumergida en un medio de control de Hank, cuyo índice es $n_{D20.} = 1{,}3347$. Resulta muy cómodo utilizar un equipo que permita un amplio desdoblamiento de la imagen, uno de los haces desdoblados deberá pasar sobre un fondo que no tenga muestra. Se determina separadamente por planimetría la superficie del núcleo y del nucléolo sobre una fotografía de aumentos conocidos. El nucléolo es homologado a una esfera y el núcleo a un elipsoide cuyo volumen es estadísticamente igual a las 2/3 partes del cilindro de igual sección. Para el nucléolo deberá deducirse la cantidad de sustancia nuclear situada por encima y por debajo de él.

Si M_{Nu} es la sustancia seca del nucléolo,
χ = al incremento de refracción específica = $= 0{,}18\ cm^3\ g^{-1}$.
F_{Nu} = la superficie del nucléolo,
V_{Nu} = al volumen del nucléolo = $4/3\ r\ F_{Nu}$ (r = radio del nucléolo).

$$\Delta_{Nu} = \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{2}\ k$$ (k = valor controlado del desfase).

φ_1 y φ_2 son los valores de la escala determinados sobre el tambor de medición del desfasador para el oscurecimiento máximo de dos imágenes del nucléolo, tenemos a:

$$M_{Nu} = \frac{\Delta Nu \,.\, F_{Nu}}{100\ X}$$

Este tipo de medición presupone que el objeto es homogéneo en todo su volumen, hecho que generalmente no se presenta. Debe disponerse entonces de un microfotómetro de barrido o tomofotómetro, equipado de un dispositivo diferencial para trazar el perfil fotométrico y hacer el cálculo punto por punto o globalmente por integración.

DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES POR ABSORCIÓN ESPECÍFICA DE UNA LONGITUD DE ONDA EN EL VISIBLE O EN EL ULTRAVIOLETA

Una medición fotométrica en el visible o en el U.V. permite la medición precisa *in situ* de determinados componentes. Éstos pueden ser los componentes normales del objeto o fijados por determinadas estructuras como consecuencia de una reacción específica.

Absorción medida y tinción utilizada	*Longitud de onda en mμ*	*Lámpara*	*Filtro*
Ácidos nucleicos, absorción natural	254	Lámpara de resonancia a vapor de mercurio	Líquido de Backstrom 0,5 M $CoSO_4$
Proteínas, reacción de Millon	365	Arco de mercurio tipo AH o FH	1,75 M. SO_4Ni
ADN, reacción de Feulgen	546	Arco de mercurio tipo AH o FH	Vidrio Corning Núm. 5840
ADN, Reacción de Feulgen	unas 550	Lámpara de arco concentrado (circonio)	Wratten 62 o 74
Ácido nucleico (PO_4), Azur-A	589	Lámpara de sodio	Nada
ADN (PO_4) verde de metilo	625	Lámpara de arco concentrado	Interferencia Farrand
ADN (PO_4), verde de metilo	646	Lámpara de arco cadmio-mercurio	Wratten 29 + 33

2/

MÉTODOS DE FIJACIÓN, DE OBSERVACIÓN, DE CORTE Y DE MONTAJE

I. — MÉTODOS DE PREPARACIÓN

LAS PREPARACIONES TEST O DE REFERENCIA

El ojo del observador es un instrumento prodigiosamente adaptado; sin darse cuenta de ello, puede compensar en la imagen dibujada numerosos y considerables defectos. Únicamente se ponen de manifiesto estos defectos en las imágenes fotográficas. Por ello es muy aconsejable que cada técnico disponga de una serie de objetos de referencia que podrá consultar en todo momento para controlar sus operaciones. A continuación, haremos referencia de los que aconsejamos:

Objetos test de la calidad óptica. — *Corrección de aberraciones.* — Se trata de portaobjetos aluminizados al vacío, portadores evidentemente de lo que se llama «pinchazo en imperdible»; en realidad se trata de la sombra de las motitas de polvo dejadas por la evaporación al vacío. Estos portas serán montados con bálsamo del Canadá y observados con una potente iluminación. Nuestro ojo observará múltiples «estrellas» brillantes sobre fondo negro. Si el sistema óptico de observación es limpio, se observa un fondo totalmente negro; si existe «luz parásita» el fondo se aprecia velado por una niebla lechosa. Si la corrección de la aberración de esfericidad del objetivo es correcta, los anillos de difracción que rodean la estrella varían de manera simétrica en los distintos planos de enfoque que se visualizan cuando se hace la disección óptica mediante la acción del tornillo micrométrico. Si la corrección es correcta en todo el campo, se aprecia observando estrellas en su centro y en sus bordes. Si el sistema óptico presenta defectos de centrado, éstos aparecen bajo forma de pequeños cometas excéntricos en relación con el eje óptico.

Objetos de test de contraste. — Se consiguen al montar pequeños fragmentos de gelatinas Wratten, uno al lado de otro, en bálsamo del Canadá, siendo la densidad de la gelatina conocida, por ejemplo 0,3-0,7 y 1,0.

Objetos test del poder de resolución. — Generalmente se utilizan los frústulos de diatomeas. Siendo el medio de montaje empleado el bálsamo del Canadá u otro equivalente (a ser posible de mayor índice de refracción*). A continuación, sigue una relación de las especies más frecuentemente empleadas y sus características:

TABLA DE DIATOMEAS QUE PUEDEN UTILIZARSE COMO TEST DE RESOLUCIÓN

Nombre	*Número de estrías por 10 μ*	*Distancia en μ de las estrías*
Pinnularia nobilis	5-6	1,90
Pinnularia viridis	7-8	1,33
Nitzschia Brebissoni.....	10	1,00
Synedra pulchella	12	0,83
Stauroneis phoenicenteron		
Pleurosigma balticum	14	0,70
Nitzschia hungarica.....		
Pleurosigma attenuatum		
Grammatophora marina	16	0,62
Nitzschia amphioxys.....		
Grammatophora serpentina.....	18	0,55
Nitzschia sigma	20	0,50
Grammatophora oceanica		
Nitzschia paradoxa	22	0,46
Surirella gemma	24	0,41
Grammatophora gracilenta....		
Nitzschia sigmoidea	26	0,38
Nitzschia obtusa	28	0,36
Nitzschia linearis		
Navicula rhomboides.....	30	0,33
Nitzschia vermicularis.....		
Nitzschia tenuis.....	32	0,31
Nitzschia palea.....	34	0,29
Nitzschia curvula	36	0,28
Grammatophora subtilissima ...	38	0,26
Amphipleura pellucida	40-42	0,25-0,24

N. del T. *Medios de montaje de índice de refracción superior al 1,515 son los que dan mejores resultados, entre ellos cabe destacar el Hyrax y el Styrax.

Objetos de test cromático. — Se consiguen montando en bálsamo del Canadá pequeños fragmentos de filtros compensadores de colores Wratten, perteneciente a la serie descrita en la página 59. La microfotografía de estos objetos es muy decepcionante ya que hace aparecer de forma estridente el relativo equilibrio de los colores de las emulsiones corrientes. Deberá tomarse la precaución de fotografiar estos tests con diferentes emulsiones y comparar los resultados, a fin de poder escoger la que ofrezca mejor rendimiento cromático de los colores del objeto. Será muy conveniente repetir dicha prueba todos los años, incluso si no se ha cambiado de emulsión, ya que

de una fabricación a otra, aunque sea de la misma marca, muchos parámetros pueden haber variado sin que se lo adviertan.

Objetos test de rutina. — El mejor de los objetos test globales es una buena preparación del objeto de su trabajo, fotografiado en blanco y negro y en colores efectuada en las condiciones lo más estandarizadas posible y cuyos clichés son conservados por su valor intrínseco. En el momento en que una serie de observaciones o de microfotografías revela una disminución de su calidad debe compararse con los clichés guardados para poder apreciar si la observación de la alteración de los resultados ha sido objetiva o subjetiva. Si la observación ha sido objetiva tendrán que adoptarse una serie de medidas sobre el procedimiento seguido, así como las indicaciones señaladas en la página 32 para subsanar los defectos.

Hay que indicar que algunos objetos test tienen una conservación limitada: ciertas tinciones, algunos fluorocromos, determinados medios de montaje se alteran, así por ejemplo la gelatina glicerinada.

REGENERACIÓN DEL MATERIAL DESECADO

Frecuentemente se dispone de material de estudio desecado. Para su estudio, o para someterlos a tratamiento acuoso, es necesario previamente «hincharlos». Para lo cual se puede utilizar:

— *Los álcalis: potasa* o *sosa, en solución al 10 %,* en frío o en caliente.

— El *amoníaco* al 50 % o al 10 % según el tipo de objeto, en frío.

— El *lactofenol* a 60° (sin hervir, de lo contrario aparecerían burbujas).

— El *cloral-lactofenol* o *lactocloral,* de mejor resultado que el anterior, debe usarse frío.

— *Alcohol fenicado* al 2 %, en frío o en caliente.

— La *antiformina* acuosa al 20 %.

— El *cloral-fenol* o *feno-cloral,* adecuado para aclarar o transparentar los tegumentos quitinosos (ver página 131).

— La mezcla de *Cendrier:* etanol de 95°: 100 ml + agua: 100 ml + acetato de etilo: 50 ml + éter: 50 ml + ácido acético: 0,5 ml; hincha, ablanda y a la vez transparenta.

— El *hidrato de cloral* en solución acuosa saturada.

— *Agua + alcohol + glicerina,* en partes iguales después de embeber la muestra en alcohol.

— *Agua acética* al 50 %.

Al escoger un medio ablandante deberá tenerse en cuenta que los álcalis empleados disuelven determinados componentes, sobre todo en caliente, y que los ácidos descalcifican las muestras. Los dos medios que preferimos, cuando no se trata de transparentar, son el *amoníaco* y el *hidrato de cloral.*

Para materiales muy antiguos: momias, fósiles orgánicos previamente desmineralizados, puede usarse el líquido de *Ruffer:* agua: 50 ml + etanol: 30 ml + carbonato sódico al 5 %: 20 ml o bien, otro más sencillo: formol al 1 %: 80 ml + carbonato sódico al 5 %: 20 ml. A continuación, endurecer las muestras con alcohol de 95°, varias veces renovado.

Cuando se quiere expulsar esporas aprisionadas en una red de hifas, se trata alternativamente el material con alcohol de 70° y después amoníaco al 50 %, haciéndolo circular entre porta y cubreobjetos, aspirando el líquido, por el extremo opuesto al lado donde se introduce, con un papel de filtro o papel secante. Las violentas corrientes que se forman expulsan las esporas (fig. 118).

El *ablandamiento* y el *hinchamiento del material desecado* se logra muy bien con el *lactofenol* concentrado o diluido, preferentemente en caliente. El *clorolactofenol* (ver pág. 175) todavía ofrece mejores resultados. Para obtener el máximo hinchamiento úsese el lactocloral, mezclado en partes iguales el hidrato de cloral con el ácido láctico.

El *material fresco* puede ser fijado y deshidratado muy rápidamente con el *clorofenol* y por el *cloralclorofenol.* El núcleo aparece admirablemente conservado y los tejidos de mayor contenido acuoso son deshidratados sin contracción. Se trabaja sobre el portaobjetos y en el caso de los materiales espesos, lignificados o fuertemente pigmentados, se calienta ligeramente. Debe re-

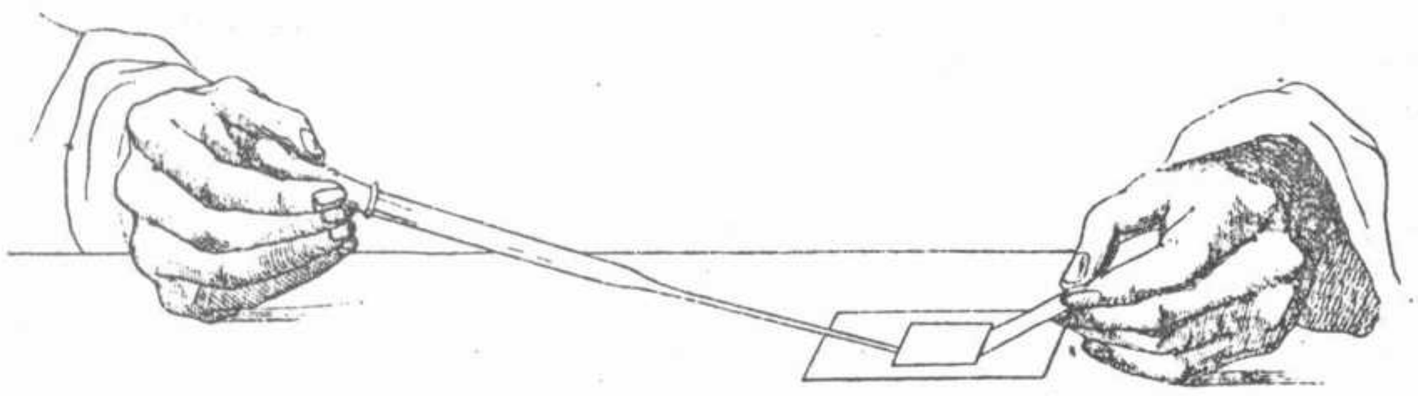


FIG. 118. — *Cambio de líquido debajo de un cubreobjetos mediante una pipeta y con ayuda de un papel de filtro, a fin de aspirar el líquido que hay debajo del cubreobjetos.*

novarse una o dos veces el líquido, aspirándolo en cada ocasión con pliegues de papel secante. Finalmente, se sustituye lentamente el cloralfenol por el bálsamo del Canadá disuelto en xilol. El conjunto de operaciones dura apenas algunos minutos.

Para *transparentar* o aclarar los materiales lignificados y altamente pigmentados debe añadirse salicilato sódico al cloral-lactofenol. Con lo que se consigue uno de los mejores agentes aclarantes que existen (ver página 174, medios de observación). Asimismo puede utilizarse el diafanol o ácido clorodioxiacético (ver: despigmentación, página 132).

Para *transparentar los órganos vegetales,* ante todo deben sacarse del alcohol, lavar con agua y después sumergirlos en lejía hasta que las piezas adquieran una tonalidad blanquecina lechosa y opaca. Lavar con agua, seguidamente tratar el material con formol al 10 %. Deshidratar progresivamente, aclarar posteriormente con tolueno, después por una esencia o mejor todavía con terpineol.

C. Gabriel y F. Pellisier han logrado un método de transparentado y de estudio de la anatomía vegetal por transparencia *(in situ)*. Empezar con el tratamiento del material con hipoclorito siendo la duración del procesado variable, según el tipo de material y su grosor (de 3 a 8 días es lo habitual, puede ser menos). Los elementos vasculares serán teñidos, bien sea con el azul de metileno alumínico, o con el verde yodo en solución hidroalcohólica (verde yodo 1 + alcohol de 90° + agua destilada 250 ml). La duración del procesado de tinción depende del grosor del material. Se elimina el exceso de colorante lavando con agua. La diferenciación se hace a lo largo de la deshidratación que debe ser rápida. Aclarar con tolueno y montar con bálsamo del Canadá o bien conservar en terpineol o en aceite de cedro. Este método permite el estudio de la anatomía topográfica de los vegetales.

Para el estudio de la *nerviación de las hojas opacas,* R. Maire aconseja hacerlas hervir en una solución concentrada de hidrato de cloral y tratarlas seguidamente con floroglucina y ácido clorhídrico mezclados con el cloral.

Medios cúpricos. — Para conservar el color verde de la clorofila, basta añadir al medio de Amann un 2 % de cloruro de cobre previamente disuelto en un poco de agua o, mejor todavía, utilizar el *lactofenol cúprico de Amann:*

Lactofenol	50 g
Agua destilada	95 g
Cloruro de cobre	2 g
Acetato de cobre	2 g

M. Kufferath aconseja una gelatina cúprica fenicada para el montaje de objetos microscópicos pigmentados de color verde. Disolver 7 gramos de gelatina en 42 centímetros cúbicos de agua, añadir seguidamente 50 centímetros cúbicos de glicerina y 1 gramo de ácido fénico. Agitar hasta que desaparezca la turbidez del medio, añadir 50 centímetros de acetato de cobre disuelto en 1 o 2 centímetros cúbicos de agua caliente. Para su uso debe hacerse fundir sobre el portaobjetos un fragmento de esta gelatina.

A los medios cúpricos puede añadírseles el *líquido de Semichon,* que permite fijar y conservar las hojas para las colecciones macroscópicas.

Agua corriente	8 ml
Formol	1 ml
Solución acuosa al 4 % de acetato de cobre neutro	1 ml

MEZCLAS CONSERVADORAS

Puede ser interesante conservar objetos durante mucho tiempo, para poderlos observar, *in toto*, o incluso seleccionarlos más tarde para su estudio microscópico. El líquido conservador debe ser: poco costoso, que altere lo mínimo posible las formas y los colores y que a la vez bloquee la difusión de los pigmentos hidrosolubles o alcohólico solubles. No existe un medio conservador universal y en cada grupo debe tantearse, así en el gran grupo de los hongos debe escogerse el medio más idóneo para cada especie, en función de los pigmentos y sus solubilidades.

Alcohol desnaturalizado de 80°, el más empleado.

Formol al 5 % acuoso para las fanerógamas, pero destiñe las algas.

Alcohol glicerinado: partes iguales de glicerina, alcohol de 90°, formol.

Agua fenicada: alcohol de 90° saturado con ácido fénico, 1 g en 100 g de agua.

Formol cúprico: agua: 80 + formol: 10 + solución acuosa al 4 % de acetato de cobre 10 ml; conserva la pigmentación clorofílica.

Líquido de Amann: agua: 95 ml + lactofenol: 50 ml + cloruro cúprico: 2 g + acetato de cobre: 2 g.

Líquido de Lutz: agua: 600 ml + etanol de 90°: 300 ml + sulfato de cobre: 25 g.

Líquido acetomercúrico: agua: 1000 ml + ácido acético: 5 ml + acetato mercúrico: 1 g.

Líquido plúmbico: agua: 1000 ml + etanol de 90°: 125 ml + acetato de plomo: 1 g.

Líquido mercuricoplúmbico: agua: 1000 + ácido acético: 10 ml + acetato de plomo: 5 g + acetato mercúrico: 0,5 g.

Líquido de Malençon: etanol de 95°: 100 ml + formol: 10 ml + ácido acético: 5 ml + agua: 20 ml. Renovar después de 24 h.

Líquido de Locquin: etanol de 80°: 1000 ml + formol: 100 ml + ácido acético: 50 ml + sacarosa: 100 g. Conserva mejor los colores que el líquido precedente.

II. — MÉTODOS DE FIJACIÓN

LA FIJACIÓN

Fijar es inmovilizar las estructuras de un material, en un estado lo más proximo posible al estado vivo.

Hay dos etapas previas o simultáneas a la fijación que no deben olvidarse: la «narcosis» (anestesiado) cuya finalidad es evitar las reacciones tisulares en contacto con el fijador y la «tanatosis», que debe matar las células lo más rápidamente posible, para evitar las autólisis y las deformaciones tisulares antes o durante las primeras etapas de la fijación.

El anestesiado previo es totalmente indispensable en los casos en que el material tenga un contenido muy elevado de agua, cuando son espontáneamente contráctiles o suficientemente grandes que permitan una fijación forzosa por perfusión.

Los anestésicos (= narcóticos)

La cocaína o la morfina. — Solución de hidrocloruro de cocaína al 2 %: 3 ml + etanol de 90°: 1 ml + agua destilada: 6 ml. Fórmula de *Rousselet-Baker* igual pero con **eucaína**.

Esperar la completa expansión o relajación del organismo, después añadir lentamente por difusión la solución precedente, esperar 10 minutos antes de añadir el fijador. Aplicable a los organismos más delicados.

El mentol o el alcanfor. — Se colocan algunos cristales en la superficie del líquido que contiene grandes animales acuáticos; los cristales se disuelven lentamente, provoca primero la relajación y después la anestesia que es completa de las 12 a las 24 horas. Pasar los animales al fijador. El método de E. J. Allen es igual pero utiliza el *hidrato de cloral.*

La nicotina en una solución de 1 g/litro, acuosa. Se hace difundir lentamente esta solución en el líquido que contiene un animal, durante 24 horas (método de Andres). Una infusión de tabaco es igualmente eficaz.

El cloroformo puede usarse en fase gaseosa o líquida. En este último caso debe tenerse una particular atención, hay que operar mediante sucesivas adiciones con ayuda de una micropipeta, durante una o dos horas: métodos de Korotneff o de Preyer. Puede mezclarse el cloroformo con la *cocaína* en medio líquido. Puede ser sustituido por el *éter* o el *etanol.*

Sales de magnesio, cloruro o sulfato. — Añadir un cristal o muy lentamente algunas gotas de una solución concentrada de una de estas sales (a lo largo de una media hora) y dejar actuar un total de una hora. Método de Tullberg.

Los tanásicos

El calor. — Aplicable únicamente a las extensiones y con ejemplares muy diminutos (células sanguíneas, bacterias, levaduras); pasar el portaobjetos sobre la llama de un mechero Bunsen o sobre una platina calefactora. A continuación pasar a alcohol.

Los fijadores diluidos. — El ácido acético, el cloruro mercúrico, el trióxido crómico adicionados, gota a gota en el medio donde se encuentran los organismos, provoca una rápida muerte y los ejemplares quedan extendidos, a la vez que los mismos fijadores a concentración normal provocarían una concentración. Traspasar seguidamente los ejemplares en un líquido fijador compatible.

La asfixia. — El traslado en agua desprovista de oxígeno, por haberla hervido, en un recipiente herméticamente cerrado, provoca a las 24 horas la muerte de los ejemplares, totalmente extendidos. El añadir un poco de nicotina facilita esta tanatosis.

Recordemos a continuación agentes muy eficaces pero asimismo muy peligrosos: el curare, la estricnina, el ácido cianhídrico.

LAS FUNCIONES DE LA FIJACIÓN

Si consideramos que la anestesia y la tanatosis no forman parte de la fijación propiamente dicha, la fijación provoca:

— la *insolubilización* de los componentes intracelulares;
— el *endurecimiento* del material para facilitar las posteriores manipulaciones.
— el *incremento de los índices* de refracción por coagulación o gelificación, aumento diferencial que ofrece una cierta diferenciación óptica.

Atendiendo a los niveles de estudio pueden clasificarse los fijadores en:

— fijadores para muestras voluminosas, en embriología y microanatomía.
— fijadores histológicos para estudio de los tejidos;
— fijadores citológicos para estudio de orgánulos intracelulares.
— fijadores para el estudio ultraestructural.

GRADO DE FIABILIDAD DE LOS FIJADORES

Pueden presentarse cuatro eventualidades.

La máxima calidad de la fijación se consigue cuando el material es mecánicamente bastante homogéneo, cuando en el fijador no ha sido sometido a retracciones diferenciales. A la vez que la velocidad de penetración del fijador es similar por toda la muestra, así como su forma de actuar. En este caso la observación vital y el examen de la muestra tras la fijación no permiten apreciar diferencias notorias.

Si la observación vital y el estudio tras la fijación permite apreciar diferencias ópticas de índices de refracción, se dice que el fijador ha actuado como un revelador de estructuras latentes. No siendo éstas «artefactos» en el sentido estricto de la palabra, ya que corresponden a una diferenciación fisicoquímica innegable. Pero la fidelidad con respecto al aspecto del objeto vivo es menos buena.

Si algunas paredes celulares son impermeables a los fijadores acuosos, lo cual es muy frecuente en histología vegetal, el contenido citoplasmático es mal conservado o incluso no queda fijado. Por lo que las tinciones posteriores son altamente irregulares y los orgánulos intracitoplasmáticos mal conservados. En este caso la fiabilidad se reduce a la arquitectura anatómica de conjunto, pero no alcanza el nivel intracelular. En este caso se prefiere destruir el contenido intracelular en una etapa más o menos previa (cf. pág. 258).

Una acusada heterogeneidad del material o el haber escogido inadecuadamente las técnicas de fijación, puede provocar la aparición de auténticos artefactos, o falsas estructuras, tales como: lagunas, agujeros, desgarres, etc. Estos artefactos pueden sin embargo proporcionar informaciones útiles, dado que están relacionados con el material en cuestión.

LOS FIJADORES SIMPLES

En oposición a las mezclas fijadoras, las usadas más frecuentemente, los fijadores simples son sustancias utilizadas con o sin adición de un disolvente, como por ejemplo el agua, no teniendo por sí solo propiedades fijadoras.

Pueden distinguirse dos grandes grupos de fijadores: los que «coagulan» total o parcialmente el citoplasma, haciéndolo más o menos opaco al observarlo al microscopio, y aquellos que, aunque metan y fijan la célula, no provocan tal modificación: son los «no coagulantes».

Los fijadores coagulantes

Son los alcoholes y principalmente el etanol (alcohol ordinario), el ácido pícrico, el cloruro mercúrico o sublimado corrosivo (potente veneno), el trióxido de cromo o el ácido crómico.

En un fijador deben considerarse los siguientes parámetros:

— concentración
— estado: líquido, solución, gaseoso, etc.;
— ionización = pH;
— potencial de óxido-reducción = rH;
— grado de pureza, marca y fabricante;
— reacción con:
  las proteínas plasmáticas, las nucleoproteínas;
— los lípidos;
— los hidratos de carbono:
— las inclusiones minerales;
— las paredes celulares: celulósicas, quitinosas, poliglucosídicas, etc.;
— velocidad de penetración;
— contracción del cuerpo fijado;
— endurecimiento;
— efectos específicos sobre algunos componentes celulares;
— dificultad de eliminación antes de la coloración;
— compatibilidad con las mezclas;
— compatibilidad con los métodos de inclusión;
— compatibilidad con los colorantes;
— efecto general sobre el aspecto de la imagen.

El etanol. — Siempre se utiliza en forma «absoluta» o casi, es decir, no contiene agua. Siendo el etanol extremadamente higroscópico, los frascos de alcohol absoluto deben contener un potente deshidratante, como el sodio, para conservar su titulación. El etanol es un líquido muy móvil, de 0,791 de densidad a 20 °C, hirviendo a 78° y solidificándose a –112°. Es miscible en todas las proporciones con el agua. El alcohol absoluto es miscible con el benceno sin provocar turbidez y no descompone el carburo de cadmio en acetileno. Se conserva sobre sodio metálico. No es un disolvente ionizado. Posee un potencial de óxido-reducción muy bajo: 0,14 V, únicamente el formaldehído lo tiene más bajo. Forma un azeotropo con el benceno hirviendo a 68° y un azeotropo

ternario con el agua y el benceno hirviendo a 65°. Su destilación sobre sulfato de cadmio anhidro da alcohol subabsoluto de 99,95 %, mientras que su destilación simple o fraccionada da únicamente alcohol de 96°.

Sus propiedades como fijador son conocidas desde la más remota antigüedad; ya fue usado por los egipcios para embalsamar, es decir, para fijar cuerpos. En el año 1663 R. Boyle lo presentó en Oxford como un fijador anatómico. Jussieu y posteriormente Réaumur lo utilizaron, siendo Clarke quien descubrió el interés de su asociación con el ácido acético.

Coagula las proteínas provocando un ligero desplazamiento de su punto isoeléctrico; esta coagulación es una función de la temperatura; por debajo de –15° no provoca ningún efecto. No coagula las nucleoproteínas, por lo que éstas se mantienen insolubles en agua.

No fija los líquidos, la mayoría de ellos son solubles en el etanol. Los pone de manifiesto separándolos de algunos complejos lipoproteicos.

No fija los hidratos de carbono, a excepción del glucógeno.

Penetra bastante rápidamente en los tejidos, a excepción del plasma sanguíneo.

Contrae bastante fácilmente las células y los tejidos, un 50 % aproximadamente de su volumen inicial. Bajo este aspecto es el peor fijador.

Endurece, es decir, confiere rigidez a los tejidos en un orden de unas 4600 veces su elasticidad inicial. Por lo que es el mejor para conseguir el efecto endurecedor.

Como consecuencia de la coagulación destruye los orgánulos intracelulares, y como consecuencia de la contracción deforma el núcleo y el nucléolo.

Siendo miscible en todas las proporciones con los disolventes bencénicos no debe eliminarse antes de pasar a estos compuestos.

No tiene ninguna influencia especial sobre la mayoría de los colorantes, pero debido a lo considerado anteriormente, no puede impedir determinadas difusiones, dado que es mal fijador de los hidratos de carbono, de los lípidos, etc.

En resumen, empleado solo es un fijador mediocre, pero posee ciertas propiedades en determinadas condiciones: es compatible con otros muchos fijadores (cf. tabla, pág. 127), siendo el único que puede utilizarse puro con el metanol, la acetona y el dioxano.

El ácido pícrico o trinitrofenol. — Se utiliza en solución acuosa saturada; peso molecular: 229,1. Es un cuerpo cristalizado en pajuelas amarillas, funde a los 122°, siendo poco soluble en el agua: 1,4 %, siéndolo algo más en el etanol: 4,9 %, y todavía más en el benceno: 10 %.

Es un explosivo cuando se ha calentado, y es detonante al golpear.

Es el único fijador que puede ser a la vez fijador y colorante.

Es muy ácido, pH 1,33 a 1,60 en solución acuosa saturada; siendo su potencial de oxidorreducción de 0,82 V.

Sus propiedades endurecedoras fueron mencionadas por Ranvier en 1875 y por Flemming en 1879, quien lo utilizó ampliamente para fijar los cromosomas.

Es un coagulante por adición de la mayoría de las proteínas y de las histonas del núcleo básico. Es probable que las proteínas ácidas no sean insolubilizadas. Los ácidos nucleicos, sin embargo, permanecen bajo su forma soluble.

No ofrece ninguna reacción especial con los lípidos.

Salvo al glucógeno no fija los hidratos de carbono.

Tiene escasa velocidad de penetración y contrae medianamente los materiales, salvo en el caso de que las proteínas ácidas se encuentren en cantidad importante, como es el caso de los espermatozoides.

Apenas endurece, por lo que los tejidos quedan blandos, lo cual es muy interesante para las operaciones posteriores.

Debido a esto algunos seudópodos tienden a separarse del cuerpo celular, las mitocondrias tienden a fragmentarse, los cromosomas se conservan mal.

No es necesario lavar después de haber efectuado la fijación, el alcohol y el benceno solubilizan bien el exceso de fijador, en los consabidos pasos a que se somete el material previa inclusión. Si se conserva una cierta tonalidad amarillenta que pueda interferir, puede eliminarse con una solución de carbonato de litio o por la acción de un colorante ácido.

El fijador confiere un carácter acidófilo al citoplasma y la disolución de ácidos desoxirribonucleicos provoca el mismo efecto en el núcleo.

Es un buen fijador de la topografía histológica, pero no tan bueno para la conservación de los detalles intracelulares.

Es compatible con la mayoría de los restantes fijadores.

El cloruro de mercurio o sublimado corrosivo. Se utiliza en solución acuosa saturada.

Cristaliza en largas agujas incoloras, funde a los 275°, se sublima a 301°, solubilidad en agua del 7 %, igualmente en el etanol y en el benceno.

Antiséptico, desinfectante; muy tóxico; intensificador de imágenes en fotografía.

Poco ionizado en solución, pH 3,25 al 5 %, la acidez aumenta durante la fijación.

Es un oxidante: 0,75 V al 5 % en solución acuosa.

Fácil de obtener puro por sublimación.

Sus propiedades como fijador fueron estable-

cidas por Chaussier hacia 1820. Blanchard en 1847 lo empleó para fijar los organismos marinos directamente en el agua de mar. Lang lo popularizó en 1878.

Se trata de un potente coagulante de todas las proteínas por fijación sobre los grupos sulfidrilos. Estos enlaces se intensifican en un medio ácido. En medio alcalino la fijación se hace sobre los grupos carboxilos. Coagula poco los ácidos ribonucleicos y las nucleoproteínas.

Reacciona muy poco con los lípidos, salvo con los fosfolípidos. Libera algunos lípidos de su complejo lipoproteico.

Es un excelente fijador de los mucopolisacáridos o mucinas.

Penetra moderadamente en los tejidos.

Contrae poco los tejidos, pero en general se produce una contracción ulterior en el proceso de la inclusión en parafina.

Es un endurecedor moderado, pero hay un considerable incremento de esta propiedad tras el paso de las muestras por el alcohol.

Puede considerarse como el mejor fijador de tipo coagulante.

Siendo soluble en el alcohol no es necesario lavar el material antes de la deshidratación. Sin embargo, en el caso de que se detecte la presencia de precipitados amorfos o cristalinos en la preparación, se disolverán con un tratamiento de los cortes con una solución alcohólica de yodo (Heidenhain, 1909).

Es compatible con la mayor parte de los colorantes, tanto ácidos como básicos.

Se trata de un excelente fijador de los cromosomas, sin embargo, con una cierta tendencia a la contracción.

Es compatible con otros muchos fijadores; el ácido acético reduce su solubilidad.

El trióxido de cromo o ácido crómico. — Empleado a la concentración del 0,5 %. Peso molecular de 100,0.

Cristales pardos o pardo-rojizos, delicuescentes, funden a 198°, muy solubles en agua; 62,4 %. En solución acuosa se comporta como ácido crómico, un ácido bastante fuerte, pH 1,12 al 1 %.

Se reduce fácilmente, rH: 1,08 V al 1 %. No cambia durante la fijación.

Desde 1840 ha sido utilizado por Hannover. Fue Mayzel quien en 1878 descubrió sus buenas propiedades como fijadores de cromosomas; fue ampliamente utilizado sobre todo tipo de material por Flemming hacia 1879.

Es un potente coagulante de las proteínas, incluyendo las nucleoproteínas.

Se trata de un excelente fijador de lípidos, de ahí su utilización en la «poscromatización» para insolubilizar las grasas tras la aplicación de otro fijador.

Oxida los polisacáridos en aldehídos, lo que permite ponerlos en evidencia mediante el reactivo de Schiff. De manera general, los convierte en cromotropos.

Tiene escasa penetrabilidad y contrae poco los tejidos.

Es un débil endurecedor.

Utilizado solo es un mal fijador. Se mejora al añadirle sales neutras.

Es muy importante llevar a cabo un intenso lavado en agua antes de pasar al alcohol o acidificar a éste con un 2 % de ácido sulfúrico, de lo contrario se producen molestos precipitados.

Proporciona acidofilia al citoplasma y la cromatina conserva su afinidad hacia los colorantes básicos.

Añadiéndole un 0,75 % de cloruro sódico es un excelente fijador histológico, incluso en pequeñas proporciones, del orden del 0,01 %.

No es compatible con el formaldehído y el etanol.

Los fijadores no coagulantes

El formaldehído. — Es un gas incoloro que se licua a –19°.

Se utiliza en solución acuosa del orden del 40 %. La solución comercial no es pura: contiene trazas de ácido fórmico y de un 6 al 15 % de metanol, detalle que debe recordarse: esta es la composición del «Formol» comercial. Polimeriza lentamente en solución, estropeándose, siendo acelerado el proceso por el frío y la presencia de metanol contrarresta este proceso. Su acidificación puede ponerse de manifiesto por el enrojecimiento del rojo neutro (indicador).

Es un compuesto de escaso poder ionizante, siendo su acidez despreciable, siendo muy ácida la solución comercial por la presencia de ácido fórmico y antes de su utilización debe neutralizarse, bien sea por adición de piridina, o por carbonatos de litio, de calcio o de magnesio. Por ello se utilizará como indicador del pH el rojo neutro.

Es un ligero oxidante, pH 0,23 V, siendo el más débil de los utilizados.

Sus propiedades antisépticas, así como las de agente fijador fueron descubiertas en 1893 por Blum.

Reacciona con los grupos NH_2 de las proteínas sin provocar coagulaciones, es excelente fijador de las nucleoproteínas, de la hemoglobina y de lípidos. Sin embargo, al dejar el objeto durante un tiempo excesivamente prolongado en formol éste provoca que los fosfolípidos tiendan a emigrar fuera de las células.

Salvo al glucógeno, el formol no fija a los carbohidratos.

No contrae a los tejidos, más bien tiene un efecto contrario, a no ser que se utilice en solu-

ción salada: R. Maire, o bien azucarada: M. Locquin.

Es endurecedor de los tejidos, únicamente el etanol y la acetona lo superan.

Se trata de un excelente fijador, máxime si se le añade una sal o incluso glucosa, únicamente el ácido ósmico lo aventaja.

Tras la fijación con formol no es necesario hacer un lavado del material.

Este fijador acidifica el citoplasma por lo que éste adquiere basofilia como la cromatina.

Es desaconsejable cuando se pretende incluir el material en parafina; contrariamente proporciona excelentes resultados con los cortes obtenidos por congelación, así como para el material destinado a ser incluido en colodión.

No es compatible con el ácido ósmico.

El tetraóxido de osmio o ácido ósmico. — Solución acuosa al 1 %.

Se presenta en forma de cristales de color amarillo pálido que funden a 41°, emitiendo importantes cantidades de gases, siendo altamente tóxicos, fijándose en la córnea, ¡y en las mucosas nasales y bucales! Tiene una solubilidad en agua del 7,24 %, del 375 %, así como en las parafinas y en los lípidos. La mayoría de sus compuestos son negros o de color gris oscuro por reducción en dióxico de osmio. La luz provoca esta reducción que es amortiguada por los agentes oxidantes, así como por el cloruro sódico.

Es neutro, siendo su pH: 0,64 V.

Sus propiedades como agente fijador fueron descubiertas en 1850 por F. Schulze.

Se trata de un fijador por adición, actuando sobre los dobles enlaces, bloqueando los grupos aminados de las proteínas, así como sobre los aminoácidos; actúa sobre todos los cuerpos grasos insaturados ennegreciéndolos. Salvo al glucógeno no fija a los carbohidratos.

Tiene escasa penetrabilidad en los tejidos aunque no los contrae. Endurece muy poco a los tejidos, por lo que se cortan mal tras una inclusión en parafina.

Desde el punto de vista de conservador del aspecto vital de la célula es el mejor de los fijadores, es desaconsejable utilizarlo cuando se piensa efectuar una inclusión del material en parafina.

Deben lavarse cuidadosamente los tejidos con agua destilada antes de pasarlos al alcohol, el cual se reduciría y se ennegrecería.

El citoplasma fijado será teñido por colorantes básicos, así como el núcleo por lo que resulta difícil aplicar tinciones diferenciales.

Es compatible con los restantes fijadores, salvo con el etanol y el formaldehído. Al mezclarlo con cloruro mercúrico, con trióxido de cromo, con dicromato potásico impiden su ennegrecimiento a la luz.

El ácido ósmico se vende en ampollas precintadas de 0,5 gramos. Para utilizarlas con efectividad deben seguirse forzosamente alguno de los métodos siguientes, evitando todo contacto con los dedos y con cualquier objeto reductor.

Sacar las etiquetas de las ampollas en ambos casos y lavarlas con una mezcla sulfocrómica y después con abundante agua. Situar la ampolla en un cristalizador con agua templada a 40-50° para fundir su contenido. Retirarla del agua pasándola por agua corriente fría para cristalizar su contenido en la periferia de la ampolla. Hay que desechar cualquier ampolla cuyo contenido sea pardusco. Situar cada ampolla en un frasco de tapón esmerilado lleno de agua destilada para asegurar la dilución deseada. Conservar en fresco y en la oscuridad. Al utilizar debe romperse la ampolla con una varilla de vidrio previamente calentada bajo la llama de un mechero Bunsen. Es innecesario decir que el frasco que deba contener la solución final debe haber sido previamente lavado cuidadosamente con agua y posteriormente con la mezcla sulfocrómica y finalmente bien enjuagado con abundante agua.

El segundo procedimiento de preparación, más peligroso, consiste en limar la ampolla, calentarla a la llama y tirarla en una botella con agua fría, entonces se rompe espontáneamente. En ambos casos debe aguardarse dos días para conseguir una perfecta disolución.

Para evitar una reducción prematura del óxido de osmio en solución acuosa deben añadirse unas gotas de una solución diluida de permanganato potásico hasta adquirir la solución una tonalidad rosada y cuando la solución se decolore hay que volver a añadir otras gotas. El yodato sódico es igualmente eficaz pero no permite el control visual de la coloración como en el caso anterior.

El dicromato potásico o bicromato. — Concentración estándar del 1,5 % en agua.

Se presenta en forma de grandes tabletas o prismas rojo anaranjados, solubles al 10 % en agua; insolubles en etanol; no es delicuescente (a diferencia de la sal de sodio).

Ionizante, pH 4,05 al 2,5 %.

Con igual acidez, actúa igual que el trióxido de cromo.

H. Müller lo empleó en 1860 y a partir de entonces se utiliza para la elaboración de las soluciones de Zenker y de Helly.

A un pH inferior a 3,5 es un fijador coagulador, homólogo al trióxido de cromo, a un pH más elevado gelifica sin coagular las proteínas ni las histonas. Fija determinados lípidos y es actualmente utilizado de forma rutinaria con este fin en la poscromisación descubierta por Benda en 1886.

No es fijador de los hidratos de carbono, ni siquiera del glucógeno.

Tiene alta velocidad de penetración en los

tejidos, sin provocar su retracción, aunque exista una posterior contracción durante el proceso de la inclusión. Los tejidos no quedan endurecidos.

Se trata de un buen fijador de tipo general, sin embargo, es desaconsejable utilizarlo cuando se quiere hacer una inclusión en parafina.

Debe lavarse con abundante agua corriente para evitar la formación de precipitados.

Es incompatible con el etanol por insolubilidad, con el formaldehído debe utilizarse enseguida.

El ácido acético. — Concentración estándar: solución acuosa al 5 %.

Se trata de un líquido incoloro, cristaliza a 16,6°, hirviendo a 118°. Se le denomina ácido acético glacial o cristalizable cuando es anhidro, ya que cristaliza fácilmente a 16,6°.

Es un ácido medio. Su solución al 5 % tiene un pH = 2,4; su potencial de oxidorreducción es del orden de 0,77 V.

Sus propiedades conservadoras, bajo su forma de vinagre, son conocidos desde la más remota antigüedad. En 1851 Corti, y más tarde Clarke, lo introdujeron como fijador mezclado con el etanol.

Precipita las nucleoproteínas y rompe los enlaces amida de las cadenas proteínicas. Solubiliza las histonas.

La mayoría de los lípidos son mal fijados; la esfingomielina, el colesterol, así como algunos otros, son solubles en ácido acético.

No fija ningún tipo de hidrato de carbono.

Tiene una velocidad media de penetración y un efecto dilatador. Dicha dilatación es seguida de una contracción durante el proceso de la deshidratación, a menos que se asocie con otro fijador. Los tejidos fijados con el ácido acético quedan muy blandos.

No es necesario efectuar ningún lavado tras la fijación.

El citoplasma adquiere una intensa acidofilia, sin embargo, puede teñirse también con colorantes básicos.

El pH óptimo para una excelente fijación es de 4,0.

Es compatible con los restantes fijadores.

Los otros ácidos: fórmico, propiónico, butírico, glucólico, glicérico, láctico, glucónico tienen propiedades comparables al ácido acético.

Sin embargo, el ácido tricloroacético es un coagulante muy diferente.

La relación siguiente da las concentraciones óptimas de utilización:

■ COAGULANTES: Metanol, etanol y acetona: 100 %; ácidos nítrico y clorhídrico: 0,5 N; ácido tricloroacético: 2 %; ácido pícrico y cloruro mercúrico a saturación; ácido cloroplatínico: 0,5 %; trióxido de cromo: 0,5 %.

■ NO COAGULANTES: Formaldehído: 40 %; tetraóxido de osmio: 1 %; dicromato potásico: 1,5 %; ácido acético: 5 %.

LAS MEZCLAS FIJADORAS

Después de lo anteriormente expuesto se aprecia que todos los fijadores simples tienen ventajas e inconvenientes. Sus únicos méritos consisten en una interpretación químicamente simple de los resultados. Desde hace más de un siglo, las mezclas fijadoras han sido mencionadas en la bibliografía científica sin que en la mayoría de los casos sus promotores hayan dado la más mínima explicación o justificación comparativa. La más grande fantasía preside sus denominaciones, cada autor se cree autorizado para cambiar el nombre del fijador al añadir algunas gotas de un tercero o cuarto componente, incluso si no se registran modificaciones en las propiedades iniciales de la mezcla, o en el caso de modificar las proporciones primitivas, frecuentemente sin conseguir notables modificaciones en las propiedades fijadoras de la mezcla.

Ha llegado el momento de actuar de forma más racional y escoger ante todo, como ya señalaba J. R. Baker en 1958, de las casi 2000 fórmulas publicadas hasta la actualidad, las 60 de uso más frecuente, mencionando sus principales aplicaciones; esto es lo que se ha hecho en el presente Manual y que describiremos seguidamente; hemos añadido un nombre compuesto alusivo de los principios activos de la mezcla.

La fecha de introducción de la fórmula sigue al nombre del autor, las concentraciones son indicadas en gramos, salvo en el caso del ácido acético y el agua que se indican en mililitros, el formaldehído se considera siempre concentrado.

Fijadores para muestras voluminosas, estudios embriológicos y de microanatomía

Formoacético mercúrico de STIEVE pH = 2,0.

Formaldehído:	8
Ácido acético:	4
Cloruro mercúrico:	5,3
Agua:	100

Mercurio-acético, pH = 2,3.

Cloruro mercúrico:	6,8
Ácido acético:	5,3
Agua:	100

Clorometanol ácido, de PERENYI (1882), pH = = 0,35.

Etanol:	43
Trióxido de cromo:	0,21
Ácido nítrico:	4,0
Agua:	100

Fijadores para histología

Picroformol ácido de BOUIN (1897), pH = 1,2 a 1,6.

Ácido pícrico:	1,2
Formaldehído:	11
Ácido acético:	5,6
Agua:	100

Picroformol cúprico de HOLLANDE (1918), pH = 3,5.

Ácido pícrico:	4
Formaldehído:	4
Ácido acético:	1
Acetato de cobre:	2,5
Agua:	100

Picroformol mecuricocúprico de GERARD, pH = 3,7.

Igual que el anterior pero añadiéndole un 10 % de solución acuosa saturada de cloruro mercúrico.

Etanol mercúrico ácido de GILSON (1898), pH = 1,0.

Etanol:	6,5
Cloruro mercúrico:	2,2
Ácido acético:	0,43
Ácido nítrico:	1,3
Agua:	100

Formomercúrico tricloroacético, Susa de HEINDENHAIN (1916), pH = 0,9.

Cloruro mercúrico:	4,9
Formaldehído:	8,8
Ácido acético:	4,4
Ácido tricloroacético:	2,2
Cloruro sódico:	0,54
Agua:	100

Formopicromercúrico tricloroacético de HALMI (1952), pH = 1,3.

Igual que el anterior pero añadiéndole un 10 % de solución acuosa saturada de ácido pícrico.

Dicromomercúrico ácido de ZENKER (1894), pH = 2,3.

Cloruro mercúrico:	5,0
Dicromato potásico:	2,5
Ácido acético:	5
Sulfato sódico:	1,0
Agua:	100

Fijadores para histología y estudio cromosómico

Formopicrocromácido de ALLEN (1906), pH = = 1,2.

Ácido pícrico:	1,2
Trióxido de cromo:	1,7
Formaldehído:	11
Ácido acético:	5,6
Urea:	2,2
Agua:	100

Tricromoósmico ácido fuerte de FLEMMING (1884), pH = 1,3.

Trióxido de cromo:	0,79
Tetróxido de ósmio:	0,42
Ácido acético:	5,3
Agua:	100

Fijador para histología y orgánulos citoplasmáticos

Dicromoformomercúrico de HELLY (1903), pH = 4.

Cloruro mercúrico:	4,9
Formaldehído:	1,9
Dicromato potásico:	2,4
Cloruro sódico:	0,54
Agua:	100

Fijadores para cromosomas

Cloroplatoosmioacético de HERMANN (1889), pH = 1,5.

Tetraóxido de osmio:	0,42
Ácido acético:	5,3
Ácido cloroplatínico:	0,79
Agua:	100

Formotricromoácido de KARPECHENKO-NAVASCHIN (1924), pH = 1,5 a 2,8.

Trióxido de cromo:	0,43
Formaldehído:	1,4
Ácido acético:	2,9
Agua:	100

Formotricromato acético de SANFÉLICE (1918), pH = 1,6.

Trióxido de cromo:	0,77
Formaldehído:	15
Ácido acético:	4,8
Agua:	100

Fijadores para orgánulos citoplasmáticos

Dicromoósmico de ALTMANN (1894), pH = = 4,2.

Tetróxido de osmio:	1,0
Dicromato potásico:	2,5
Agua:	100

Formocádmico de AOYAMA (1929), pH = 4,8.

Formaldehído:	6,4

Cloruro de cadmio: 1,1
Agua: 100

Tricromoósmico acético de BENDA (1903), pH = 1,1.
Trióxido de cromo: 0,79
Tetraóxido de osmio: 0,42
Ácido acético: 0,19
Agua: 100

Dicromoósmico ácido ligero de BENSLEY (1911), pH = 3,0.
Tetraóxido de osmio: 0,40
Dicromato potásico: 2,0
Ácido acético: 0,12
Agua: 100

Ditricromoósmico de CHAMPY (1911), pH = = 1,7.
Trióxido de cromo: 0,39
Tetróxido de osmio: 0,44
Dicromato potásico: 1,2
Agua: 100

Tricromoósmico de LEWITSKY (1911), pH = = 1,2.
Trióxido de cromo: 0,79
Tetraóxido de osmio: 0,42
Agua: 100

Osmomercúrico de MANN (1984), pH = 4,9.
Cloruro mercúrico: 5,0
Tetróxido de osmio: 0,50
Cloruro sódico: 0,37
Agua: 100

Formosmomercúrico crómico de MAXIMOV (1909), pH = 2,5.
Cloruro mercúrico: 4,3
Formaldehído: 3,5
Tetróxido de osmio: 0,17
Dicromato potásico: 2,3
Sulfato sódico: 0,86
Agua: 100

Formodicromato débil de REGAUD (1910), pH = 4,6.
Formaldehído: 8,7
Dicromato potásico: 2,6
Agua: 100

Dicromomercúrico neutro de ZENKER (1894), pH = 3,6.
Cloruro mercúrico: 5,0
Dicromato potásico: 2,5
Sulfato sódico: 1,0
Agua: 100

Nota: Recuérdese que el formol comercial contiene un 40 % de formaldehído.

Fijadores que no aseguran la conservación de los lípidos

Etanol acético de CLARKE
Etanol absoluto: 3 volúmenes
1 volumen de ácido acético.

Etanol cloroformacético de CARNOY
Etanol absoluto 6 vols.
Cloroformo 3 vols.
Ácido acético 1 vol.

Etanol-Formol de SCHAFFER (1908)
Etanol de 80°: 2 vols.
Formol comercial neutralizado 1 vol.

Etanol mercúrico de APATHY
Etanol: 100 ml
Cloruro mercúrico: 4
Cloruro sódico: 0,5

Etanol picroformolado ácido de BRASIL (1905), pH = 2,2.
Etanol: 180
Ácido pícrico + formaldehído: 36
Ácido acético: 23

Etanol formolado ácido de LOCQUIN (1975), pH = 2,0.
Etanol de 80°: 1000
Formol comercial: 100
Ácido acético: 50
Sacarosa: 100
Agua: 200

COMPATIBILIDADES

C = compatibilidad química; *I* = incompatibilidad química; *PC* = compatibilidad parcial (mezclas inestables, deben prepararse extemporáneamente). V. tabla de página siguiente.

TIEMPOS DE FIJACIÓN

Depende del tipo de muestra, de su volumen, así como de la composición del fijador. Con algunos de ellos, es muy importante no sobrepasar un tiempo máximo a fin de evitar que la muestra presente alteraciones, pérdida de afinidad hacia los colorantes. A continuación se indican algunos datos a recordar:

El formol solo, si previamente se ha neutralizado, puede conservar, sin alterar, las piezas durante varios años. Siendo el tiempo óptimo de fijación 24 horas.

Los picroformoles para piezas pequeñas el tiempo óptimo es de 24 horas, las de mayor tamaño de 3 a 5 días.

El formopicrocromoácido de Allen conserva las piezas indefinidamente.

Los formomercúricos tienen tiempos de fijación de 2 a 24 h, atendiendo al tamaño de las piezas.

El formoacético mercúrico de Stieve necesita de 1 a 3 días de fijación.

El formotricromato acético de Sanfélice admite de 12 a 24 h; procurar no pasarse, requiere un lavado en agua de 24 horas.

El dicromomercúrico ácido de Zenker requiere 24 h de fijación y 24 h de lavado. Las mismas características presenta el formodicromato débil de Regaud.

Para los fijadores etanólicos, no conservadores de los lípidos, tienen tiempos de fijación que oscilan de 12 a 48 h, atendiendo las características de las piezas, hay que procurar no sobrepasar este tiempo. Únicamente el etanol formolado de Locquin admite tiempos de permanencia de varios años con una relativa conservación de los colores.

	Metanol	Etanol	Acetona	Ác. tricloroacético	Ác. pícrico	Ác. Cloroplatínico	Cloruro mercúrico	Trióxido de cromo	Dicromato potásico	Ácido acético	Formaldehído	Tetraóxido de osmio
Metanol	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*I*	*I*	*C*	*C*	*I*
Etanol	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*I*	*I*	*C*	*C*	*I*
Acetona	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*I*	*I*	*C*	*C*	*I*
Ác. tricloroacético	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*
Ác. pícrico	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*
Ác. Cloroplatínico	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*
Cloruro mercúrico	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*
Trióxido de cromo	*I*	*I*	*I*	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*	*PC*	*C*
Dicromato potásico	*I*	*I*	*I*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*PC*	*C*
Ácido acético	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	●	*C*	*C*
Formaldehído	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*PC*	*PC*	*C*	●	*I*
Tetraóxido de osmio	*I*	*I*	*I*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*C*	*I*	●

LOS FIJADORES CITOLÓGICOS

En citología, sobre todo cuando las células han sido aisladas, la comparación entre el aspecto en observación vital y el aspecto del material fijado, y posteriormente teñido, es muy inmativa. Los fijadores son escogidos teniendo en cuenta, más que su velocidad de penetración y la uniformidad de su acción, el grado de conservación de los orgánulos celulares.

Agentes físicos. — **Desecación.** — A temperatura ambiente por la evaporación, tras haber efectuado la extensión, a temperaturas moderadas: por paso rápido del portaobjetos sobre la llama, o bien a baja temperatura, del orden de –70°: por criodesecación, preferentemente bajo vacío. Este último método se aplica preferentemente en las fijaciones histoquímicas.

Agentes químicos. — **El tetróxido de osmio** en fase gaseosa es el mejor conservador de los orgánulos intracitoplasmáticos, aparte la criodesecación, a condición de que el grosor del citoplasma a atravesar no exceda a los 100 µm. Se aconsejará por consiguiente para las extensiones y aposiciones.

Las **mezclas cromoósmicas,** cuyos componentes, según los casos, son el trióxido de cromo, el dicromato potásico, el ácido acético, el ácido cloroplatínico, el cloruro mercúrico, el nitrato de uranilo, hacen perder algunas de las propiedades de la fijación ósmica, pero como contrapartida permiten fijar células o tejidos mucho más gruesos, así como la posterior inclusión en parafina. Sus nombres y composición se indican a continuación:

Cromoósmica de FLEMMING:

OsO_4 al 2 %:	4 ml
CrO_3 al 1 %:	15 ml
Ácido acético:	1 ml

Cromoósmica de BENDA: igual que la anterior, añadiendo 3 gotas de ácido acético.

Cromoósmica de LAGUESSE:

OsO_4 al 2 %:	4 ml
CrO_2 al 1 %:	8 ml
Ácido acético:	2 gotas.

Cromoósmico de MESVES:

OsO_4 al 2 %:	4 ml
CrO_3 al 0,5 %:	15 ml
Ácido acético:	2 gotas.

Osmocloroplatínico acético de HERMANN:

OsO_4 al 2 %:	4 ml
Ácido cloroplatínico al 1 %:	15 ml
Ácido acético:	1 ml

Osmodicromocloroplatínico de LINDSAY-JOHNSON:

OsO_4 al 2 %:	10 ml

Ácido cloroplatínico al 1 %: 15 ml
Dicromato potásico al 2,5 %: 70 ml
Ácido acético: 5 ml

Osmodicromato de ALTMANN:
OsO_4 al 2 %: 10 ml
Dicromato potásico al 5 %: 10 ml

Osmocromomercuriouranilo de BENOIT:
OsO_4 al 2 %: 5 ml
Dicromato potásico al 5 %: 6 ml
Cloruro mercúrico al 5 % en líquido fisiológico natural: 5 ml
Nitrato de uranilo al 4 %: 4 ml

Osmoditricrómico de NASSONOV:
OsO_4 al 2 %: 4 ml
Trióxido de Cr al 1 %: 8 ml
Dicromato potásico al 3 %: 8 ml

Osmoditricrómico de HIRSCHLER: *a)* débil: 1/3/3 ml; *b)* fuerte: 8/4/4 ml

Osmodicromato de BENSLEY:
OsO_4 al 2 %: 4 ml
Dicromato K al 2,5 %: 16 ml
Ácido acético: 2 gotas.

Las **mezclas crómicas** sin osmio; debe prepararse extemporáneamente:

Cromoformol de ORTH:
Agua: 100 ml
Dicromato K: 2,5 g
Sulfato de Na: 1 g
Formol: 1 ml

Cromoformol de KOPSCH:
Dicromato K al 3,5 %: 4 ml
Formol: 1 ml

Cromoformol de REGAUD: igual que el anterior pero con un 3 % de dicromato K.

Cromoformol de KOLSTER:
Dicromato K al 5 %: 4 ml
Formol: 2 ml
Alumbre crómico al 5 %: 4 ml

Dicromomercuroformol de MAXIMOV:
Cloruro mercúrico: 5 g
Dicromato K: 2,5 g
Sulfato de Na: 1 g
Agua: 9 ml
Formol: 1 ml.

Los fijadores con otros metales:

Urano-formol de RAMÓN Y CAJAL:
Nitrato de uranilo: 85 ml
Formol: 15 ml

Cobaltoformol de DA FANO:
Nitrato de cobalto: 85 ml
Formol: 15 ml

Cadmioformol de ADYAMA:
Cloruro de cadmio: 85 ml
Formol: 15 ml

En todos los casos el formol ha sido previamente neutralizado.

Tiempos de fijación y elección. — Los tiempos óptimos de fijación son de 12 a 24 horas, seguidos de un cuidadoso lavado en agua.

Las mezclas *cromoósmicas* no conservan el condrioma, sin embargo, se conservan bien las restantes estructuras citoplasmáticas, inclusive los lípidos. Pueden ser utilizadas para la fijación de muestras delgadas. Para incluir en parafina es recomendable pasar el material por esencia de cedro.

Las mezclas *crómicas* sin osmio son excelentes fijadores del condrioma. Si contienen cloruro mercúrico fijan bien los dictiosomas. Penetran en las piezas a una profundidad de 3 mm. El dicromomercuroformol de Maximov es aconsejable para la fijación de los granos de secreción.

Las mezclas a base de uranio, cobalto y cadmio son aconsejables para la impregnación argéntica de los dictiosomas y conservan a la vez el condrioma.

No es aconsejable que un laboratorio tenga todos estos fijadores. Nuestra elección reducida comprende:

El tetróxido de osmio — el cromoósmico de Flemming — el osmodicromato de Bensley — el cromoformol de Regaud — el osmodicromato de Altmann — el dicromomercurioformol de Maximov — el urano formol de Ramón y Cajal.

COMPATIBILIDADES DE INCLUSIÓN

Algunos fijadores no son recomendables con una posterior inclusión en parafina: el formol, el etanol concentrado; otros son desaconsejables para la inclusión en celoidina: todos los picroformoles, con o sin etanol y los formomercúricos.

PENETRABILIDAD

Este factor debe tenerse en cuenta para las grandes piezas. Entre los que no se han clasificado en nuestra relación de fijadores para piezas voluminosas, hay que citar sin embargo como muy penetrantes: el formotricromato acético de Sanfélice y todos los líquidos alcohólicos no aseguran la conservación de lípidos.

COMPATIBILIDADES CON LAS TINCIONES

Algunos colorantes no pueden ser utilizados después de algunas fijaciones; entre otros, son:

Los tiacinos después del formol.

Los colorantes lipídicos después de todos los fijadores alcohólicos.

DESCALCIFICACIÓN

Cabe señalar que todos los fijadores ácidos son descalcificantes; por lo cual deberá prescindirse de un fijador de pH inferior a 6 cuando se trata de estudiar la conservación de las sales calcáreas. Dado que la descomposición de determinadas sales de calcio provoca la formación de gotas de gas es aconsejable eliminarlas con una trompa de agua varias veces a lo largo de la fijación.

VOLUMEN A UTILIZAR

No insistiremos suficientemente que un fijador debe ser siempre usado en exceso con relación al volumen de la pieza: mínimo 10 con los fijadores osmificados, óptimo 40 e incluso más, sobre todo para las grandes piezas. Después de usarse el líquido debe ser desechado.

ELECCIÓN EN FUNCIÓN DEL MATERIAL A ESTUDIAR

Los parámetros relacionados a continuación son los que determinarán la correcta elección del fijador a usar:

- fragilidad y contenido en agua del material;
- tamaño del objeto;
- método de inclusión;
- estructuras a conservar;
- tinciones a aplicar;
- heterogeneidad de tejidos;
- impermeabilidad de algunas membranas;
- objeto del estudio: topográfico, microanatómico; histológico; citológico; histo o citoquímico, ultraestructural.

Es deseable que haya una selección de fijadores habituales en un laboratorio; junto con M. Gabe aconsejamos para todos los laboratorios que trabajan con mamíferos:

El *picroformol ácido* de Bouin.

El *formopicromercúrico tricloroacético* de Halmi.

El *formodicromato débil* de Regaud.

El *etanol cloroformoacético* de Carnoy.

El primero será de aplicación muy generalizada, ya que conserva los lípidos y la mayoría de las reacciones histoquímicas. El segundo será preferentemente seleccionado para estudios citológicos más delicados. El tercero para estudios nucleares, el cuarto para los tejidos con elevado contenido en agua.

Para todos aquellos tejidos que tengan células impermeables al agua aconsejamos: o bien una inmersión previa en etanol antes de la fijación, durante algunos segundos, bajo el vacío creado por una trompa de agua, o bien en el etanol cloroformoacético de Carnoy.

Para los que deseen conservar las piezas para poder efectuar un posterior estudio, sin tinción, con el máximo de sus pigmentos naturales, pero sin los lípidos, preferimos el etanol formolado ácido de Locquin.

Finalmente, para aquellos que deseen un fijador que vaya aunque sea mediocremente bien para todo, recomendamos el formol al 40 %.

FINALIZACIÓN DE LA FIJACIÓN

No siempre se puede someter el material a todo el procesado de forma continua, desde la extracción del material, a la tinción y después al montaje. Por ello es importante poder interrumpir el procesado después de la fijación y poner las piezas en conservación.

Únicamente los fijadores cromados no pueden admitir espera después del final de la fijación y un abundante lavado de 24 h en agua.

Con los restantes fijadores se puede pasar directamente al alcohol de deshidratar y mantener las piezas en él durante cierto tiempo. Cuando se trata de tenerlas durante bastante tiempo en espera es preferible conservarlas en benzoato de metilo, en salicilato de metilo o en butanol, teniendo además la ventaja de que se evaporan mucho menos.

Tras su permanencia en butanol se puede proceder directamente a la inclusión, o someter el material a dos baños en benceno cuando las piezas proceden del benzoato o del salicilato de metilo.

Si no interesa deshidratar inmediatamente, se utilizarán, tras la fijación, los siguientes líquidos conservadores:

El *formaldehído* neutralizado al 4 % (10 % del formol comercial).

El *formol cadmiocálcico* de Baker 1944:

Agua:	90 ml
Formol comercial:	10 ml
Cloruro de cadmio:	1 gramo

Pero siempre debe tenerse en cuenta que la mejor conservación de las piezas es en forma de bloque de inclusión, sea en parafina o en celoidina

FIJADORES DE LAS ESTRUCTURAS ULTRAMICROSCÓPICAS

Más que en ninguna ocasión conviene en este caso que la fijación tenga lugar de forma inmediata a la extracción de la muestra.

Fijador ósmico tamponado con el líquido de Palade. — Preparar la solución de base:

Tetraóxido de osmio:	1 g
Acetato sódico al 1,904 %:	5 ml
Veronal sódico al 2,58:	5 ml
Solución de ClH al 0,1 N:	5 ml
Agua destilada:	35 ml

Ajustar el pH a 7,38, añadiendo ClH si es demasiado básico o alternativamente una gota de ácido acético, después una gota de veronal sódico al 2,58 % hasta alcanzar el pH deseado, en el caso de que sea demasiado ácido. Conservar en frío y en la oscuridad. No debe usarse en caso de que el fijador tenga color rosado.

Fijador ósmico tamponado de Sjöstrand. — Preparar tres soluciones madre:

A = acetato sódico:	9,714 g
Veronal sódico:	14,714 g
Agua:	500 ml
después,	
B = ClNa:	8,5 g
Agua:	100 ml
y	
C = ClH 0,1 N	

Mezclar en el momento de usar: 20 ml de A
7,2 ml de B
22 ml de C
0,18 ml de agua.

Fijadores ósmicos tamponados a base de calcio. La adición de 0,01 % a un 1 % de Cl_2Ca a uno de los fijadores anteriormente mencionados mejora considerablemente la fijación de algunas de las estructuras nucleares.

Fijador ósmico dicromatado de Dalton:

Solución de dicromato al 4 %:	1 vol.
Solución de ClNa al 3,4 %:	1 vol.
Solución de tetróxido de osmio al 2 %:	2 vols.

Todo queda tamponado a pH 7,2 mediante la potasa 2,5 N.

Fijador a base de permanganato de Luft:

Solución acuosa de permanganato al 1,2 %:	15 ml
Soluc. acuosa de acetato Na al 1,904 %:	5 ml
Soluc. de veronato sódico acuoso al 2,58 %:	5 ml
ClH 0,1 N:	5 ml

Trabajar a 0°. Muy aconsejable para la fijación de las membranas.

Aldehído fórmico. — Solución al 10 % de formol comercial seguido de una postosmificación o poscromisación (cf. p. 232).

Glutaraldehído en solución al 2,5 % tamponado con cacodilato Na, a pH 7,2. Preparar en el momento de usar, en frío. Lavado posterior con la solución tampón.

Congelación ultrarrápida. — En el isopentano o isopropano a –150°. También en el helio a –272°. Se obtienen las bajas temperaturas con los hidrocarburos trabajando en un recipiente refrigerado con nitrógeno líquido y no con aire líquido que formaría una mezcla explosiva con los hidrocarburos. La glicerina acuosa del 2 al 30 % evita la formación de cristales de hielo.

Tiempos de fijación. — Los tiempos de fijación son en general de una a dos horas para las muestras que no sobrepasan el milímetro cúbico y de forma preferente para casos de capas finas de un cuarto de milímetro de grosor, sobre todo en el caso de los fijadores ósmicos que son muy poco penetrantes.

PRESIONES OSMÓTICAS DE LOS FIJADORES SEGÚN J. R. BAKER, 1933

Formol al 4 %	32
Ácido acético al 5 %	20
– crómico al 0,5 %	1,4
– ósmico al 1 %	1,2
– pícrico (soluc. ac. sat.)	2,5
Dicromato potásico al 1,5 %	3,3
Bicloruro de mercurio (soluc. ac. sat.)	5
Bouin	100
Flemming fuerte con ácido acético	23
– débil con ácido acético	4,3
Altmann	5,8
Mann	7,3
Da Fano	41
Sangre de mamífero	6,7

III. — TRANSPARENTADO

DESMINERALIZACIÓN Y REBLANDECIMIENTO

Previa inclusión de muestras duras, estén o no calcificadas, deben someterse a tratamientos particulares. Incluso los objetos, incluidos naturalmente en las rocas pero que a pesar de la alteración debido a la fosilización debe extraerse total o parcialmente su materia orgánica mediante reactivos análogos. Es por ello que serán tratados en este capítulo.

Descalcificación. — Se aplica tanto para el tratamiento de muestras que contienen sales calcáreas como para el tratamiento de fósiles englobados en una roca calcárea. Para ello utilizan cualquiera de los reactivos siguientes:

Ácido nítrico al 6 % — ácido sulfuroso al 5 % — ácido tricloroacético al 5 % preferentemente con formol al 10 % — ácido fórmico al 5 % preferentemente formolado al 10 % — trióxido de cromo y dicromatos al 2 % — ácido pícrico en solución acuosa saturada — etilen diamin tetraacetato de sodio al 5 % o formolado al 10 %. Los tres primeros reactivos actúan muy rápidamente, los siguientes actúan cada vez más lentamente. Siempre es aconsejable efectuar un vacío moderado y sucesivo sobre la solución y cambiarla varias veces antes de la total descalcificación.

Cabe subrayar que todos aquellos fijadores que contengan uno o varios de estos reactivos mencionados son a la vez potentes agentes descalcificadores. Debe tenerse en cuenta que si se utilizan como fijadores, el agente fijador deberá ser renovado varias veces ya que su acidez es eliminada por la descalcificación y su efecto fijador puede quedar sensiblemente modificado.

Cuando los tejidos a descalcificar son acuosos o frágiles conviene previamente incluirlos en celoidina, siguiendo la técnica de Bufket 1937. Se incluye la pieza en celoidina al 8 %, seguidamente se endurece con cloroformo, se reduce su tamaño hasta dejar únicamente lo esencial, a continuación se sumerge en alcohol isopropílico a efectos de eliminar el cloroformo y luego se hidrata mediante la aplicación de alcoholes de graduación decreciente: 80°, 60°, agua. El tiempo de permanencia en cada baño es de unas 24 h. Descalcificar seguidamente utilizando cualquiera de los reactivos mencionados; endurecer con sulfato sódico al 5 %; lavar seguidamente durante 24 horas con agua; deshidratar con las esencias de Apathy; incluir en parafina y cortar. Si la descalcificación hace aparecer lagunas grandes, éstas deberán llenarse de celoidina tras el paso de la muestra por el alcohol isopropílico, endurecerlas con cloroformo, incluir en parafina y cortar.

Asimismo puede descalcificarse siguiendo un procedimiento más suave y a la vez más lento: electrolíticamente o mediante resinas intercambiadoras de iones, o mediante el EDTA (etilendiamina tetraacético), el cual actúa cerca de la neutralidad.

Desilicificación. — Cuando los tejidos contienen sílice o bien están englobados en una roca silícea se puede eliminar dicha sílice mediante ácido fluorhídrico en solución acuosa al 2 % en un recipiente de plástico y al resguardo de todos los instrumentos ópticos cuyas partes de vidrio serían irremediablemente destruidas. Una vez llevada a cabo esta operación, tras descalcificación, debe neutralizarse el exceso de ácido mediante bicarbonato sódico al 10 %.

ABLANDAMIENTO DE LA QUERATINA Y DE LA QUITINA

Es imposible obtener buenas secciones de objetos demasiado heterogéneos en cuanto a su grado de dureza. Si los materiales están esclerificados, sea por queratina o por quitina, puede procederse a un reblandecimiento de las piezas teniendo presente que durante este proceso se alteran los detalles intracelulares en el caso de utilizar agentes muy activos.

Se escogerá un fijador entre los siguientes: etanol acético de Clarke, etanol cloroformacético de Carnoy, etanol mercúrico ácido de Gilson, o incluso el etanol picrotricromomercúrico de Hennings (1900): ácido nítrico concentrado: 8 ml + trióxido de cromo acuoso al 0,5 %: 8 ml + cloruro mercúrico saturado en etanol absoluto: 12 ml + ácido pícrico acuoso saturado: 6 ml + etanol absoluto: 20 ml. Tiempo de fijación de 12 a 24 h; seguir con un lavado con alcohol de 96°; deshidratación; inclusión.

En los pasos previos a la inclusión debe utilizarse únicamente el butanol o la esencia de cedro y dejar permanecer las piezas en parafina caliente, justo en su punto de fusión durante una o varias semanas.

Si únicamente se desea tener información de la topografía general del organismo pueden utilizarse agentes que no conserven las estructuras celulares:

El **dióxido de cloro gaseoso** o su solución en ácido acético, denominado «Diafanol». Es a la vez un enérgico oxidante que decolora los pigmentos melánicos. El material sacado del alcohol de 96° se pasa por alcohol de 65° y se sumerge en el diafanol renovándolo varias veces a partir del momento que se decolora, tras lavado con alcohol de 65°, deshidratado e inclusión. La duración del ablandamiento va desde algunas horas a varios días, atendiendo a la calidad de las muestras.

A fin de obtener una acción todavía más enérgica del bióxido de cloro, puede disolverse con ácido sulfúrico o nítrico en lugar del acético. Pero debe procederse con sumo cuidado dado que la mezcla ¡es explosiva! Trabajar sobre hielo.

Cuando las piezas a estudiar son muy frágiles deben incluirse en celoidina y proceder según la técnica explicada para la descalcificación.

Para preparar el dióxido de cloro gaseoso se procede de la siguiente manera: mezclar con suma prudencia 150 g de ácido oxálico pulverizado + 40 g de clorato potásico + 30 ml de agua destilada; calentar a baño maría a 60°; recoger los vapores en un frasco lavador que contenga 500 ml de agua destilada enfriada mediante hielo. Cuidado con la toxicidad del gas y a los riesgos de la explosión.

El **fenocloral** de Murray 1937 es una mezcla ablandante y aclarante a la vez, formada por hidrato de cloral y fenol, fundidos a temperatura suave a partes iguales en peso. Se sumergen en este líquido las piezas previamente fijadas y deshidratadas y tras haber pasado durante 12 h en una mezcla de: alcohol absoluto + cloroformo + ácido acético a partes iguales y con cloruro mercúrico a saturación. Debe sumergirse el material durante una semana en el fenocloral, a continuación lavar el material con xilol e incluir.

MACERACIÓN

En algunas ocasiones puede ser interesante disolver los compuestos pécticos que unen las células vegetales oxidándolos con H_2O_2, incubándolos en una solución de oxolato amónico o en una mezcla de $C10_3K$ + NO_3H, o haciéndolos hervir en autoclave con bisulfito sódico.

DESPIGMENTACIÓN

La despigmentación o blanqueamiento se lleva a cabo mediante agentes oxidantes más o menos específicos de los pigmentos que deben eliminarse.

Agua oxigenada. — Decolora las melaninas, actúa lentamente: decolorar durante 24 a 48 h en agua oxigenada de 10-30 vols., lavar con agua corriente, facultativamente puede teñirse, montar.

Cloro. — Colocar algunos cristales de clorato K en el fondo de un recipiente, por ejemplo en un tubo de Borrel, llenar de etanol de 50°, añadir con ayuda de una pipeta sumergida hasta los cristales 1 ml de ClH concentrado, situar los portaobjetos con los cortes previamente adheridos en el tubo, tapar. El cloro disuelto difunde lentamente en el etanol y decolora los cortes en 24 horas.

Bromo. — Se utiliza bajo forma de agua de bromo al 0,5 %. Tiempo de decoloración: 24 h, seguidamente lavar.

Ácido clórico. — Disolver en baño maría 50 g de clorato de bario en 70 ml de agua destilada; enfriar; añadir con precaución 8,5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 40 ml de agua destilada; decantar, conservar en frío y en la oscuridad; para usarlo debe diluirse esta solución de 8 a 10 veces con agua; decolorar durante 12 h, lavar con etanol de 70° y después con agua.

Bióxido de cloro. — Desaconsejamos la preparación de este compuesto por el peligro que conlleva. La solución comercial: el *diafanol* actúa simultáneamente como ablandante y decolorante (cf. p. 132).

Trióxido de cromo o ácido crómico. — En solución acuosa al 5 %: eficaz pero irregular.

Permanganato potásico. — En solución acuosa al 0,25 %; decolorar de 1 a 4 h; lavar con agua, blanquear con ácido oxálico al 4 % o en metabisulfito sódico al 3 %. Lavar con agua corriente.

Ácido peracético. — Decolorar de 1 a 24 h, lavar.

Ácido perfórmico. — A preparar justo antes de usar, actúa como el anterior.

Hipoclorito de Na o agua de Javel *(Lejía)*. — Diluir la solución comercial al 10 %, dejar actuar durante 24 h, lavar.

Piridina. — Pura, aclara al disolver las grasas pigmentadas.

Bromuro de yodo. — Yodo: 4 g + bromo: 6,5 g + ácido acético: 500 ml + agua: 500 ml; preparar justo antes de usar según Locquin (1940).

IV. — LA OBSERVACIÓN VITAL

EL EXAMEN VITAL

Cuando la fijación y la tinción no habían sido todavía inventadas, era frecuente extraer y observar directamente entre porta y cubreobjetos el material, en una gota de agua o en el mismo líquido en que se hallaba inmerso. Previamente, en ocasiones se había practicado una fragmentación, disociación o simplemente una microcompresión para poder separar mejor los elementos a observar.

Estas técnicas continúan utilizándose, sobre todo desde el desarrollo experimentado por las técnicas del contraste de fases y posteriormente con el contraste interferencial. Son estas técnicas las que se emplean habitualmente en protozoología y en micología.

Sin embargo, la observación vital no es fácil; no se puede hacer con toda clase de materiales: sólo es adecuada en el caso de células aisladas o fáciles de separar, con los tejidos fáciles de disociar, los órganos o las células suficientemente pequeños para ser montados entre porta y cubreobjetos; las muestras suficientemente transparentes pueden ser examinadas de esta forma consiguiendo mucha información.

Se extraen los materiales a estudiar, generalmente en medio líquido, bien sea por punción de una cavidad natural o por medio de una micropipeta se capturan organismos nadadores. A fin de favorecer la extracción y montaje de éstos es a veces útil haber efectuado una anestesia previa (cf. p. 119).

El líquido de montaje debe ser en general isotónico (cf. tabla XVIII). Si se trata de una observación corta, un montaje entre porta y cubreobjetos es suficiente; si es prolongada debe evitarse la evaporación mediante la colocación de un cordón de vaselina pura previamente colocado sobre el portaobjetos y sobre el que se dispondrá el cubreobjetos portador de la gota que contiene el material a observar. Si se está efectuando una observación vital sin haber tomado previamente esta precaución, se puede retardar la evaporación colocando cuatro gotas de aceite de parafina en las cuatro esquinas del cubreobjetos. También debe recomendarse el método de R. Maire: se prepara un portaobjetos y dos cubreobjetos de dimensiones algo diferentes, por ejemplo: un milímetro de menos de diámetro; el objeto a examinar es montado entre los dos cubreobjetos en su propio medio líquido y dispuesto sobre una gruesa gota de aceite de parafina situada sobre el portaobjetos y que al extenderse ocupará el espacio canalicular libre dejado entre los dos cubreobjetos por la desigualdad de los mismos. El aceite de parafina goza de la propiedad de ser impermeable al agua pero relativamente permeable al aire, por lo que los microorganismos no se asfixian (fig. 119).

La observación denominada «en gota pendiente» no goza de nuestras preferencias por lo siguiente: la gota forma una lente trémula que desvía los rayos lumínicos e interfiere con la iluminación, lo cual es sumamente molesto cuando se observa con contraste de fases. El empleo de portaobjetos excavados es todavía peor, porque actúa como si se tratara de una lente divergente. Únicamente las células de Van Tieghem que tienen el fondo plano no introducen ningún tipo de perturbación en la observación.

La observación vital tanto en fondo claro como en campo oscuro no presenta ningún tipo de dificultad suplementaria a las expuestas. Se recomienda la máxima limpieza de porta y cubreobjetos, así como de las lentes del sistema óptico. Siempre se iniciará la observación a pocos aumentos antes de emplear el objetivo de inmersión, ya que una vez depositada la gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos será imposible retirarla sin estropear la preparación.

El contraste de fases y el contraste de tipo diferencial sólo se emplearán para la observación de preparaciones y objetos suficientemente delgados para ello; un condensador del tipo largo focal es indispensable si se utilizan las células de Van Tieghem o los anillos de Ranvier de un determinado grosor, pero ninguna solución puede adoptarse en el caso de que el conjunto, medio más cubreobjetos, sea demasiado grueso, sobre todo en las observaciones a gran aumento (figs. 120, 121 y 122).

LAS TINCIONES VITALES

Una tinción vital es en realidad un experimento de fisiología celular, según escribe Gabe. Es decir, el operador trabaja en la infinita complejidad de la materia viva y debe por consiguiente vigilar al máximo las condiciones de trabajo, para poder, gracias a sus conocimientos fisicoquímicos, extraer importantes informaciones de sus resultados. Las tinciones vitales se utilizan para poner en evidencia estructuras morfológicas in-

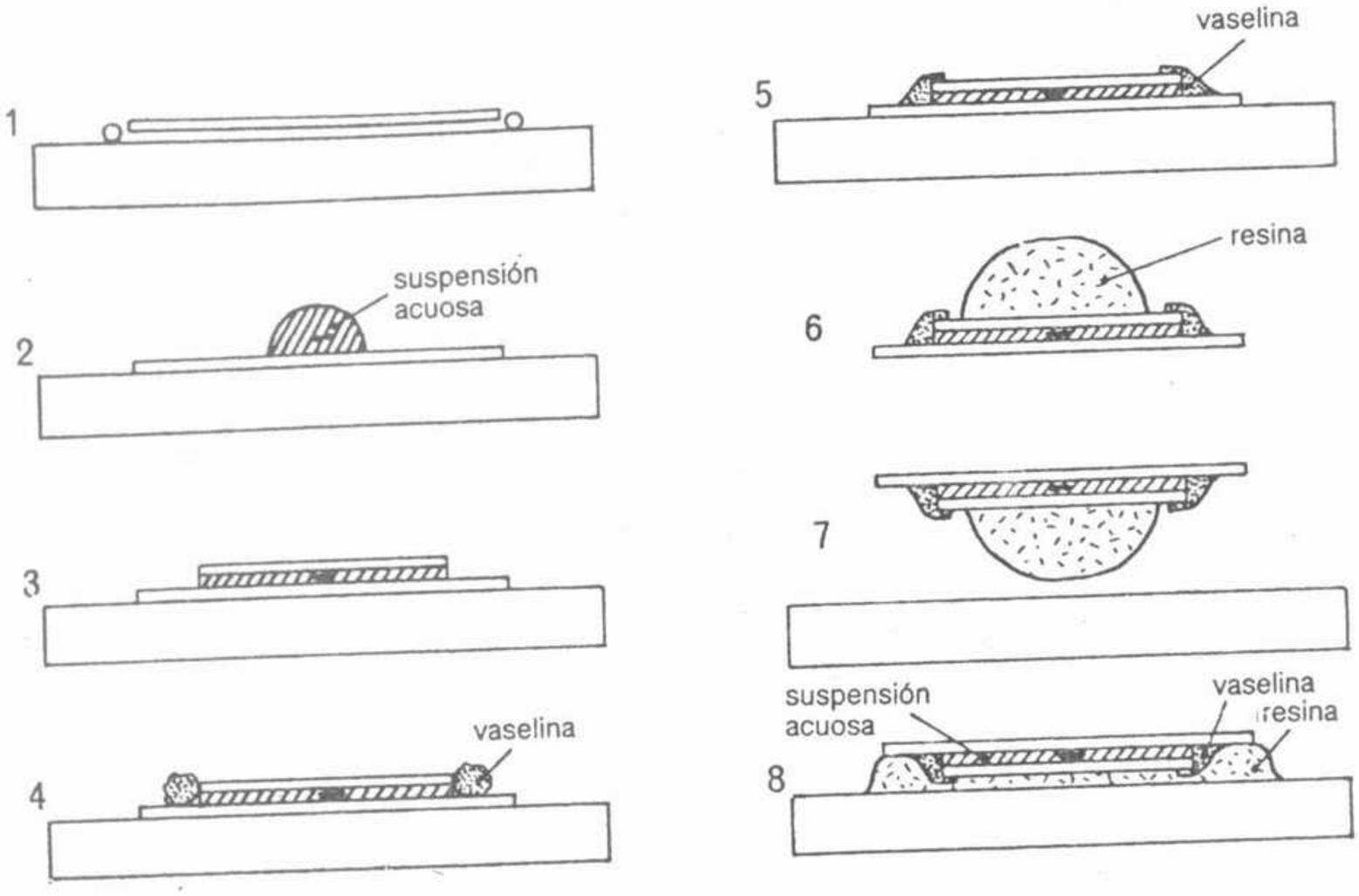


FIG. 119. — *Método del doble cubreobjetos para montar en un medio acuoso y posterior cementado con una resina según R. Maire, 1909.* 1, el cubreobjetos es colocado sobre el portaobjetos; 2, la suspensión de los objetos en una gota acuosa y es depositada, evitando los excesos; 3, es recubierta por un cubreobjetos más pequeño; 4, se rodea con vaselina; 6, se coloca una gruesa gota de resina —o aceite de vaselina— para las preparaciones no permanentes (temporales); 7, se giran los dos cubreobjetos; 8, se depositan sobre el portaobjetos aplastando la gota hasta que desborda. Para simplificar el procesado puede suprimirse la vaselina, pero entonces no queda garantizado el perfecto cementado con el bálsamo o con la resina.

tracelulares, pero a la vez para estudiar la permeabilidad de algunas interfases, la reacción celular cuando se introduce un colorante que siempre posee una mayor o menor toxicidad, incluso cuando se utiliza en concentraciones muy diluidas, ya que su concentración a nivel de los orgánulos intracelulares demuestra que el mecanismo de entrada no se debe únicamente al juego de las presiones osmóticas y de las concentraciones. Deben distinguirse tres fases: penetración, distribución y acumulación, que deben ser observados.

Se distinguen tinciones vitales propiamente dichas y coloraciones «posvitales» o «posmortales», atendiendo a que la célula esté todavía viva o, por el contrario, haya muerto cuando se hacía la observación.

Por su toxicidad en unos casos y por su insolubilidad en el agua en otros, muchos de los colorantes no se usan como vitales.

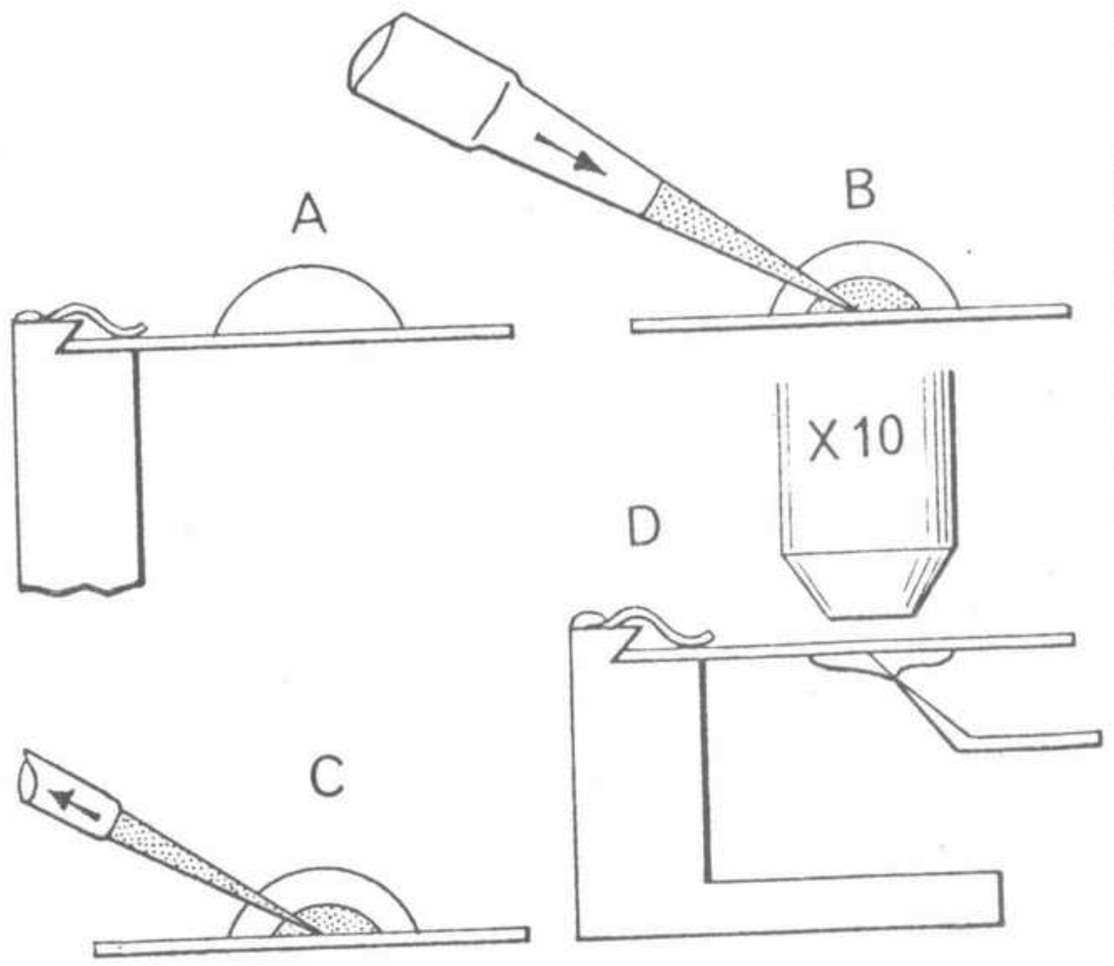


FIG. 120. — *Micromanipulación en gota pendiente.* A, B, C, preparación de la gota; D, observación; A, gota de aceite; B, inyección de la suspensión de organismos; C, disminución por aspiración del volumen de la suspensión; D, trabajo después del vuelco sobre la platina de un microscopio. Según Policard, Bessis y Locquin.

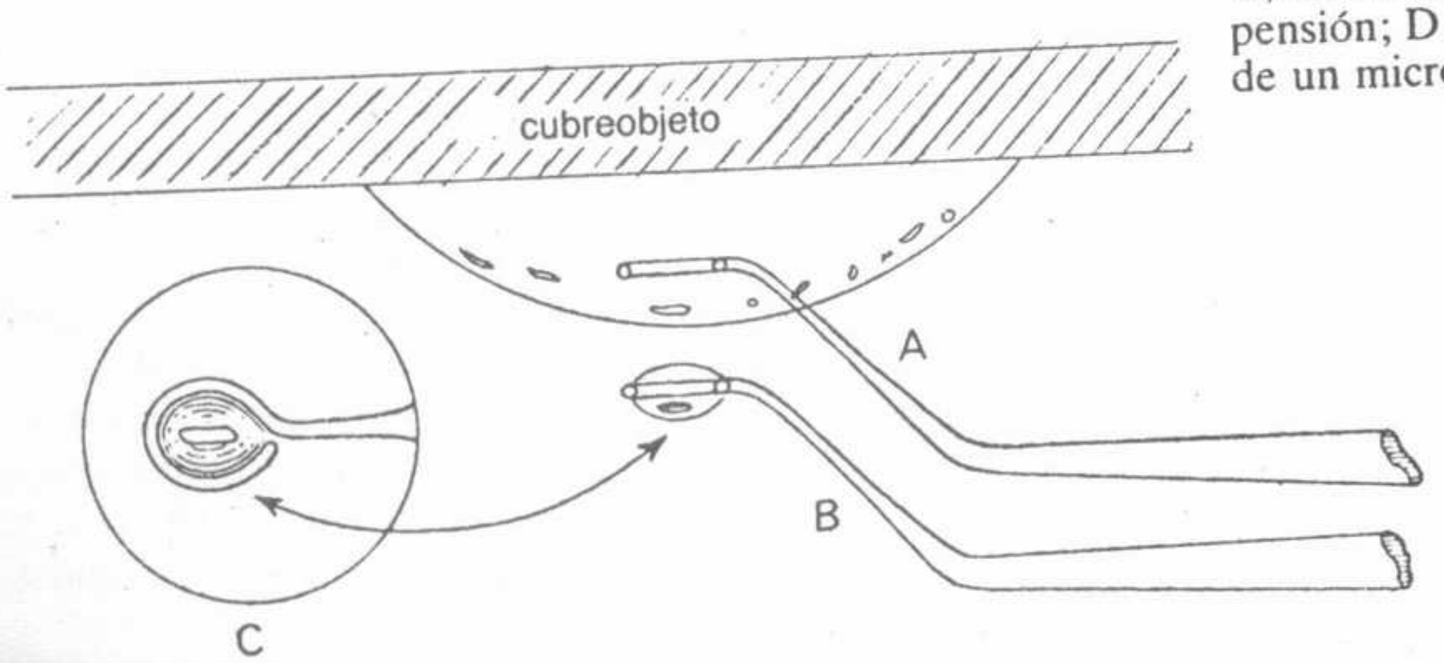


FIG. 121. — *Aislamiento de un germen con un asa en gota pendiente, en este caso no recubierta de aceite.* Documento de Fonbrune.

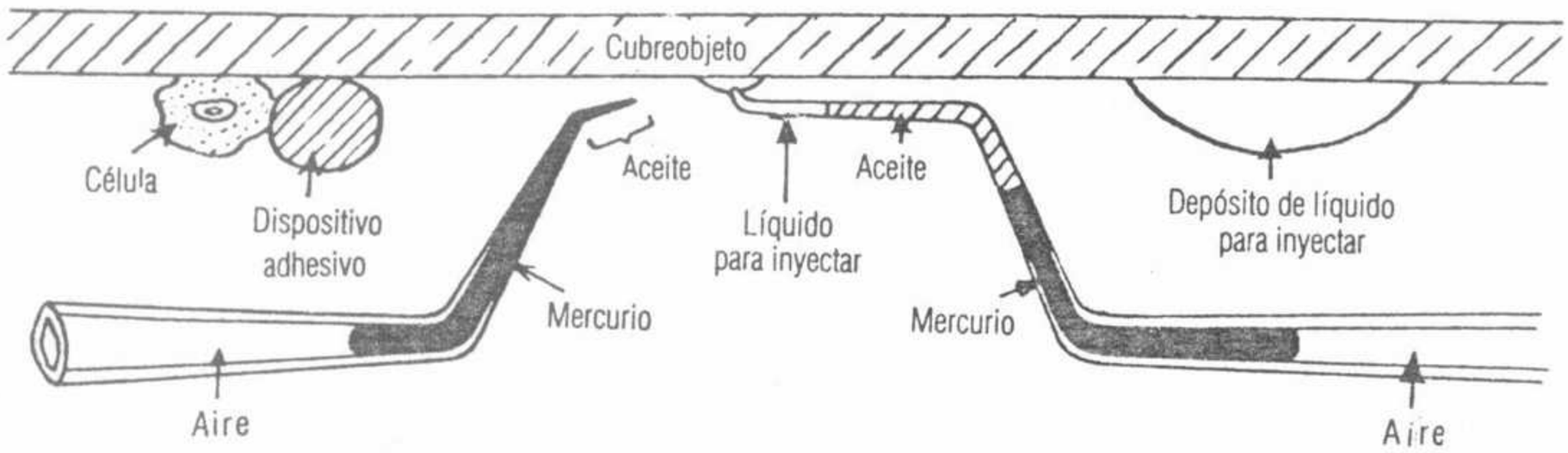


FIG. 122. — *Microinyección cuantitativa en gota pendiente.* A la izquierda, sujeción de la célula contra una fibra adherente al vidrio; a la derecha, provisión del líquido a inyectar; en el centro y a la izquierda, pipeta con pistón de mercurio, con la que se aspira un poco de aceite y, a continuación, el líquido a inyectar para efectuar la inyección a una célula del centro.

RELACIÓN DE LOS PRINCIPALES COLORANTES VITALES:

— *Colorantes ácidos:* Alizarina (oxiquinona), azul tripán, azul isamina, rojo congo (tetrazoicos);

— *Colorantes básicos:* Azul de metileno, azul de toluidina, azur de metileno (tiazinas), rojo neutro y verde Janus (azinas), violeta de crésil, azul de Nilo, azul crésil brillante (oxazinas), nigrosina (indulina), violeta Hofmann y violeta de metilo (trifenilmetano).

RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ESTRUCTURAS TEÑIDAS VITALMENTE:

Estudio general de la célula: Rojo neutro, verde Janus, azul de metileno.

Fibras nerviosas: azul de metileno, nigrosina.

Histiocitos: Azul tripán, azul isamina, rojo Congo.

Hueso: Alizarina.

Condrioma: Verde Janus, violeta Hofmann, violeta de metilo.

Vacuoma: Rojo neutro, azul de Nilo, azul de crésil.

Lipoma: Rojo neutro, azul de crésil.

Numerosas teorías se han emitido para explicar el mecanismo selectivo de las tinciones vitales. Cada una de ellas posee parte de la verdad, ya que el proceso global es infinitamente complejo.

En el grupo de los colorantes vitales pueden incorporarse determinadas sustancias cuyo tamaño de grano permite que el material se incorpore a las células por fagocitosis y su posterior acumulación en las vacuolas digestivas; entre otros, debe destacarse: la tinta China, el carmín litinado y el carminato de amonio.

MÉTODOS DE PREPARACIÓN PARA LA OBSERVACIÓN IN VIVO DE MICROORGANISMOS

Podemos preparar especialmente las muestras para observarlas en vivo con un microscopio normal o invertido. Presentamos dos casos:

Objetos en medio líquido. — Pueden emplearse los objetivos de inmersión en agua, directamente sumergidos en el líquido; pero dado que estos objetivos son poco frecuentes es preferible colocar un objetivo en seco de un «capuchón de inmersión» formado por un cilindro poseedor de una ventana transparente que se acopla sobre el objetivo, cuyo aumento no debe sobrepasar a ×40. Se regula la posición de la ventanilla de tal forma que esté lo más cerca posible del objeto.

Pueden montarse las muestras en cámaras de caras paralelas, obtenidos o por excavación en el mismo portaobjetos o bien colocando un cuadrado o escuadras de variable grosor entre el porta y el cubreobjetos (fig. 124). Los portaobjetos excavados son desaconsejables cuando se quieren hacer observaciones con contraste de fases o contraste interferencial. Las muestras deben ser oxigenadas, se observan muy bien en las cámaras de aceite de parafina ya que éstas permiten la difusión del oxígeno del aire. Estas cámaras pueden adquirirse en el comercio o bien pueden ser construidas por uno mismo atendiendo al examen de la figura 125.

Cuando hay que perfundir el cultivo para una observación de larga duración se utiliza una cámara de circulación.

Los cultivos, denominados «en gota pendiente» son más difíciles de observar que los cultivos en cámara de microcultivo por el grosor de la convexidad y las vibraciones de la gota. La observación entre dos cubreobjetos montados sobre un portaobjetos de Caratini permite hacer un examen recto-verso, pero este montaje es frágil.

Cuando se desea amortiguar los movimientos de las muestras examinadas se puede recurrir a

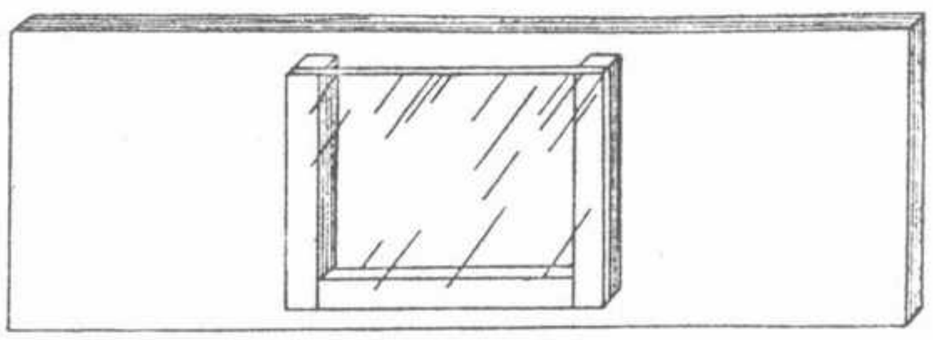


FIG. 123. — *Microacuario de Schaudin.*

una película de gelatina diluida de agar o de metilcelulosa o de alginatos, de débil concentración, a determinar experimentalmente.

Cuando se desea inmovilizar una muestra comprimiéndola ligeramente, se recubre de un cubreobjetos previamente untado al sumergirlo en una solución de gelosa al 1 % con lo que se deposita una delicada capa que posteriormente se seca. Al observar el agua para hinchar, la gelosa reduce progresivamente el espacio disponible entre porta y cubreobjetos e inmoviliza la muestra comprimiéndola progresivamente (Bessis y Locquin, 1956).

Objetos sobre una superficie sólida. — Los objetos vivos sobre la superficie de un objeto sólido son en general observados con un microscopio estereoscópico, es decir, con la «lupa binocular». Pero el aumento con este instrumento está limitado a unos 200×. Para incrementar el poder amplificante debe recurrirse a un microscopio con un solo objetivo equipado de un iluminador incidente, sea a través del objetivo, o bien alrededor de él. Algunos de estos equipamientos tienen inmersión en agua, lo cual permite el examen en un medio líquido.

Calcados por aposición. — Se puede extraer un muestreo de los objetos o de células procedentes, o bien de un cultivo, de un tejido, calcándolo, apretando el objeto sobre un portaobjetos limpio. Un determinado número de células quedan adheridas al portaobjetos cuando se retira el objeto respetando sus localizaciones topográficas. A continuación se trata el porta como si se tratara de un frotis. En el caso de los tejidos fúngicos o vegetales se puede recubrir el portaobjetos con un adhesivo o un celo de doble cara, lo cual permite arrancar un micelio o un hongo parásito de su soporte, sin arrancar las células del huésped, si se calcula bien la presión y la adherencia.

Extensión por frotis. — Cuando el material está en suspensión en un líquido, como las células sanguíneas, conviene extenderlas a fin de separarlas. Esta extensión se logra depositando una gota convenientemente calibrada cerca del extremo de un portaobjetos muy limpio, previamente pasado por la llama del mechero Bunsen a fin de aumentar su adhesividad; se coloca inclinado un portaobjetos de la forma indicada en la figura 130 y se arrastra la sangre con un movimiento rápido y regular. Si la extensión se ha llevado a cabo de forma correcta debe ser cada vez más delgada y pararse antes de llegar al extremo opuesto del portaobjetos. A nuestro juicio es preferible utilizar un portaobjetos esmerilado al cubreobjetos, utilizando evidentemente el lado corto al que previamente se habrán redondeado sus bordes.

Inclinando más o menos el portaobjetos móvil se puede controlar el grosor de la extensión: es tanto más delgada cuanto más agudo sea el ángulo formado por las dos láminas.

Asimismo puede usarse una aguja (fig. 131).

Extensión seca. — Inmediatamente después de haber efectuado la extensión se secará al aire: sea agitando el portaobjetos al aire varias veces hasta comprobar que se ha secado, lo cual se hace fácilmente a simple vista por el cambio de aspecto adoptado por la extensión, o bien pasándola por una corriente de aire caliente por encima (no dentro) de la llama de un mechero Bunsen. La desecación no impide la posterior fijación. Si no se fijaran las células éstas se desprenderían cuando se sumergen los portas en los líquidos.

Extensiones húmedas. — Cuando se fija con un agente gaseoso el frotis recién hecho se debe colocar cara abajo sobre el fijador que emite vapo-

FIG. 124. — *A la izquierda, cámaras húmedas de Ranvier, redonda y cuadrada; a la derecha, cámara húmeda con canal.*

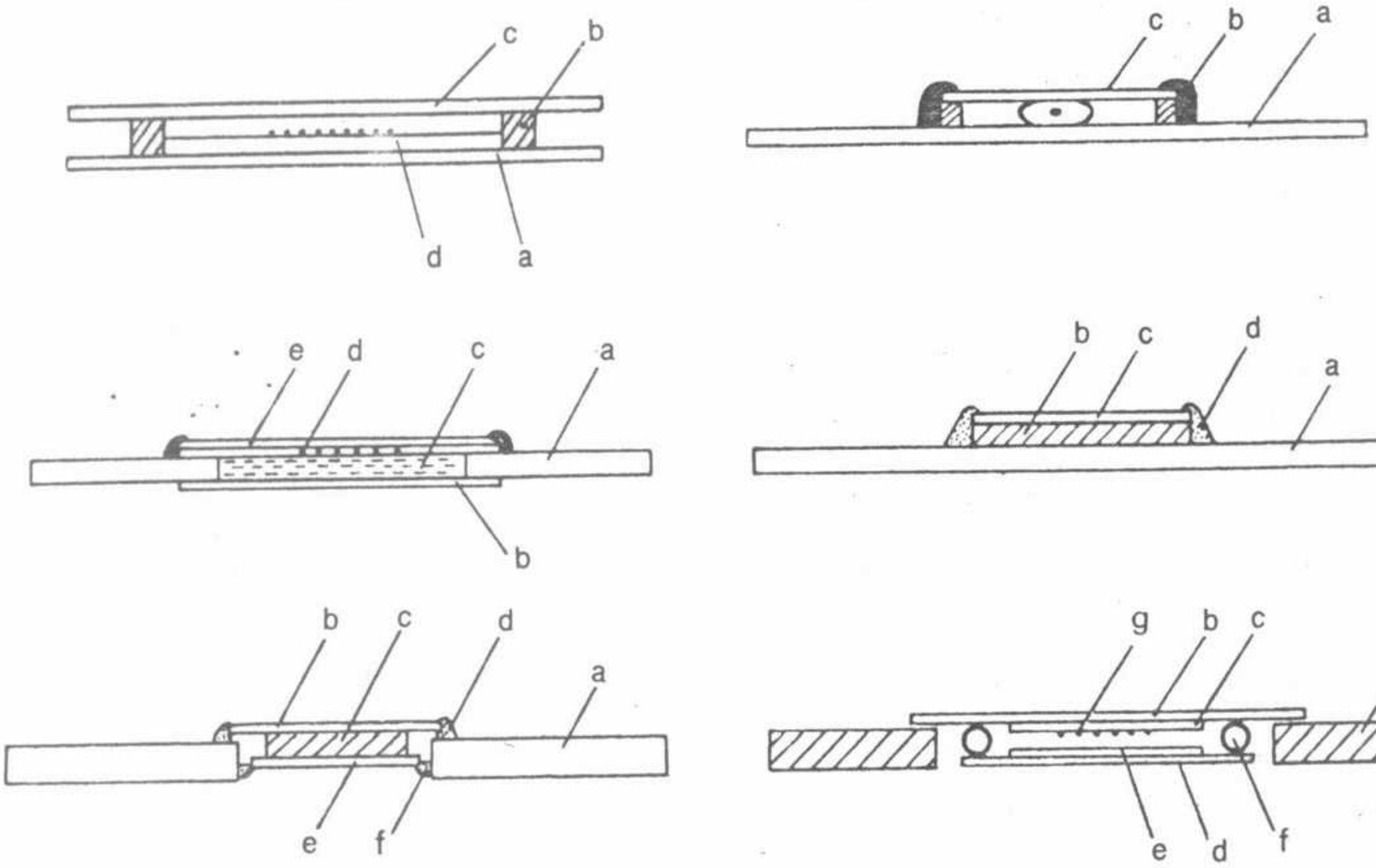


FIG. 125. — *Cámaras de cultivo.* Arriba y a la izquierda, cámara con dos cubreobjetos con cuñas plásticas adheridas; a y c, cubreobjetos; b, cuñas; d, llenado. A la derecha, cubreobjetos sostenido por una cuña; a, portaobjeto; c, cubreobjeto; b, cuña recubierta de vaselina. En el centro, a la izquierda, cámara de parafina sobre portaobjeto perforado; a, portaobjeto perforado; b, cubreobjeto inferior adherido; c, parafina líquida; d, objetos en su líquido; cubreobjetos cementado con parafina o vaselina. A la derecha, con un simple anillo de vaselina. Abajo y a la izquierda: cámara de gelosa sobre un portaobjetos agujereado y metálico: a, portaobjetos; b y e, cubreobjetos cementados por vaselina; c, gelosa que contiene las muestras. A la derecha, cámara aérea de gelosa: a, portaobjetos perforado, o en U; b, cubreobjeto superior; muestras g sobre la gelosa c; d, cubreobjeto inferior revestido por una capa de gelosa; e, para evitar las gotitas de condensación; f, cordón hermético de vaselina. Debe procederse muy asépticamente para preparar las cámaras o esterilizarlas con rayos U.V. antes de introducir las muestras. Documentos Zeiss.

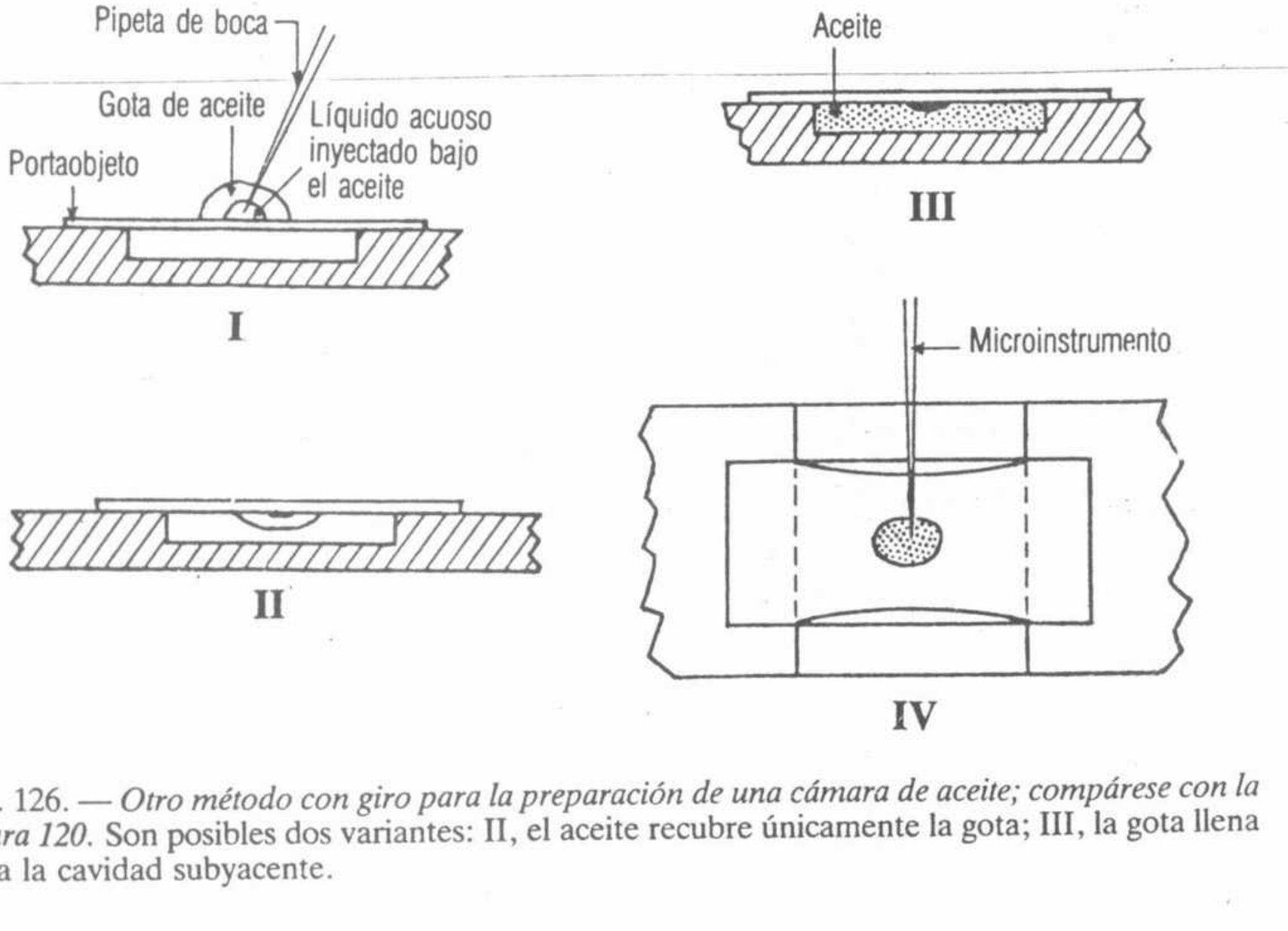


FIG. 126. — *Otro método con giro para la preparación de una cámara de aceite; compárese con la figura 120.* Son posibles dos variantes: II, el aceite recubre únicamente la gota; III, la gota llena toda la cavidad subyacente.

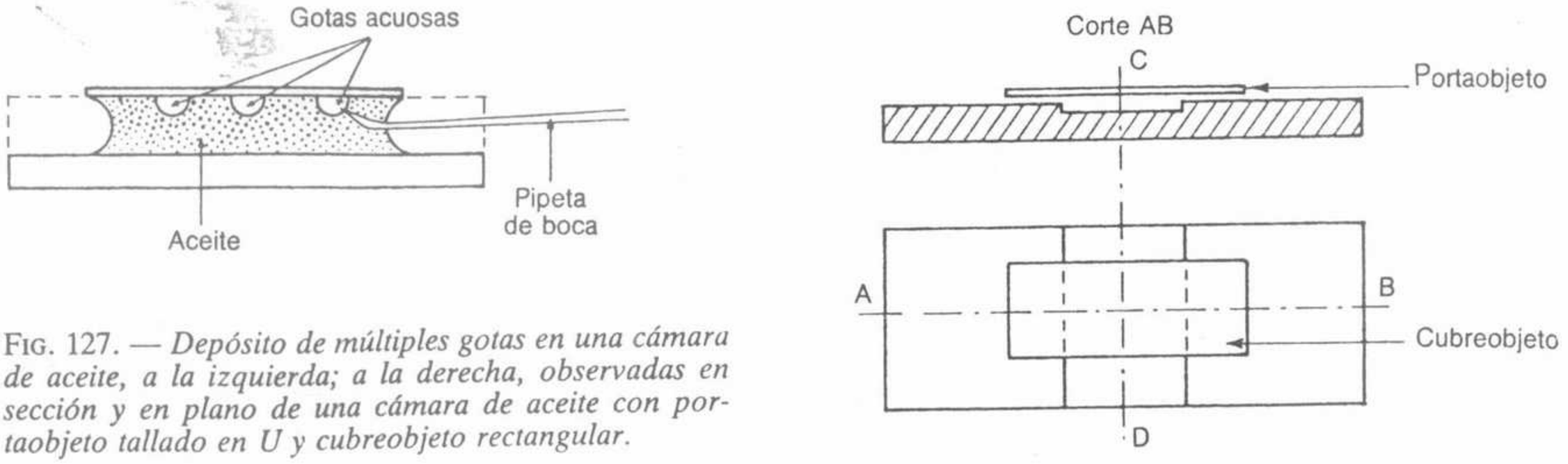


FIG. 127. — *Depósito de múltiples gotas en una cámara de aceite, a la izquierda; a la derecha, observadas en sección y en plano de una cámara de aceite con portaobjeto tallado en U y cubreobjeto rectangular.*

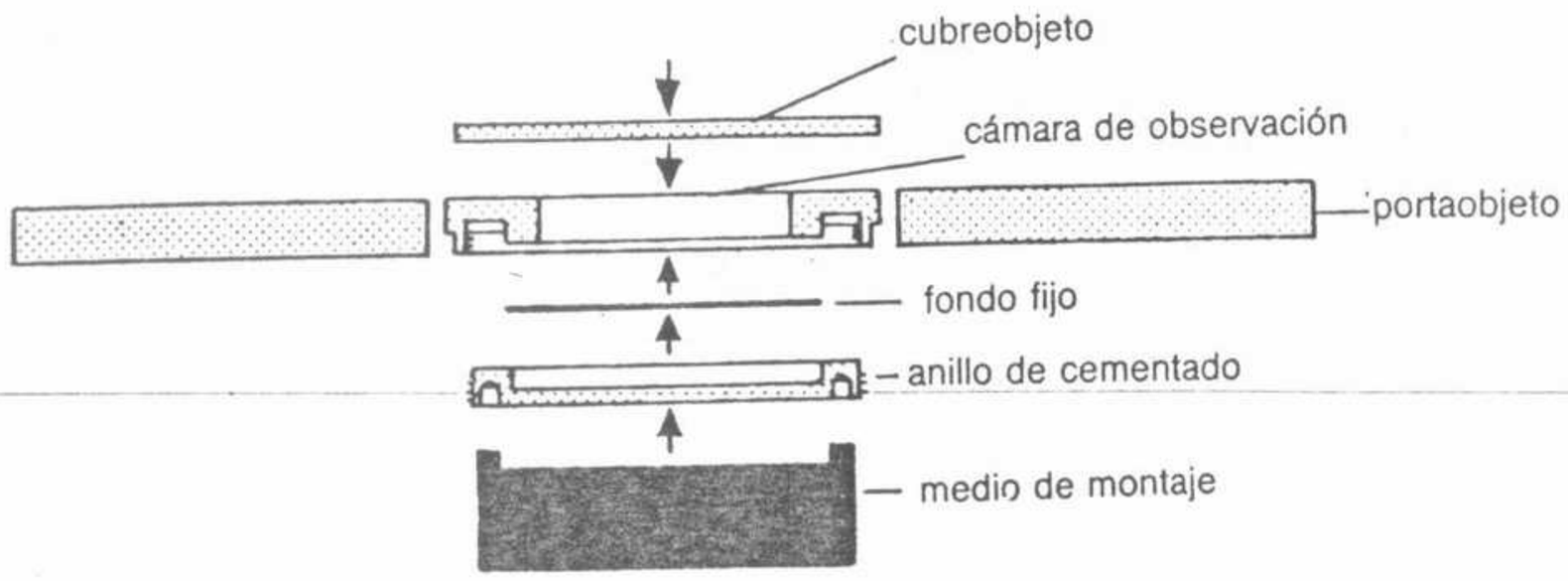


FIG. 128. — *Cámara de cultivo y observación desmontable.* La cubeta del fondo se ha obtenido con un poco de vaselina esterilizada y el portaobjeto está cementado con aceite de parafina, dejando pasar el aire para los cultivos aeróbicos. Documentos Zeiss.

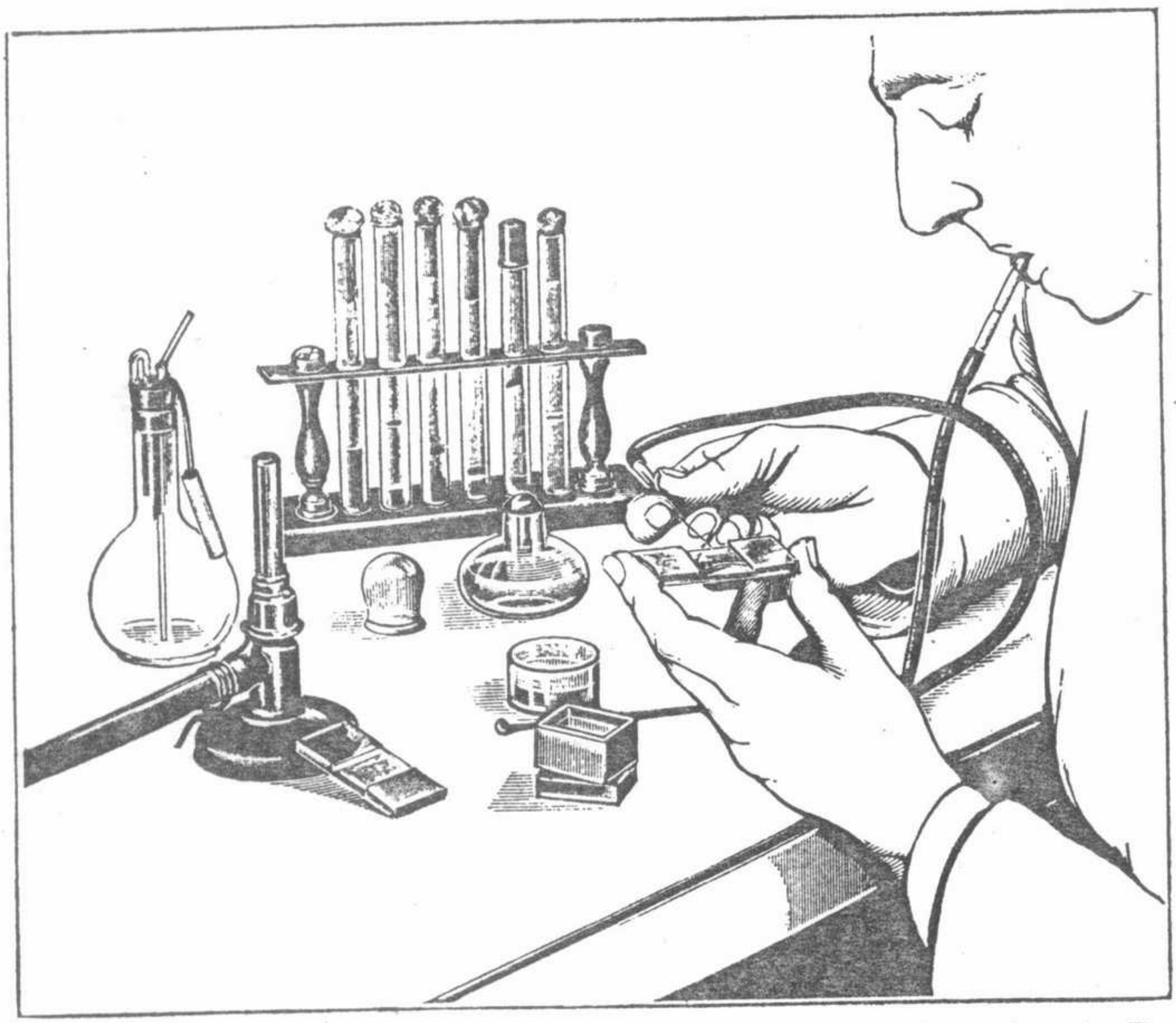


FIG. 129. — *Manera de proceder para sembrar con una micropipeta de boca, una cámara de aceite.* Documento de Fonbrune.

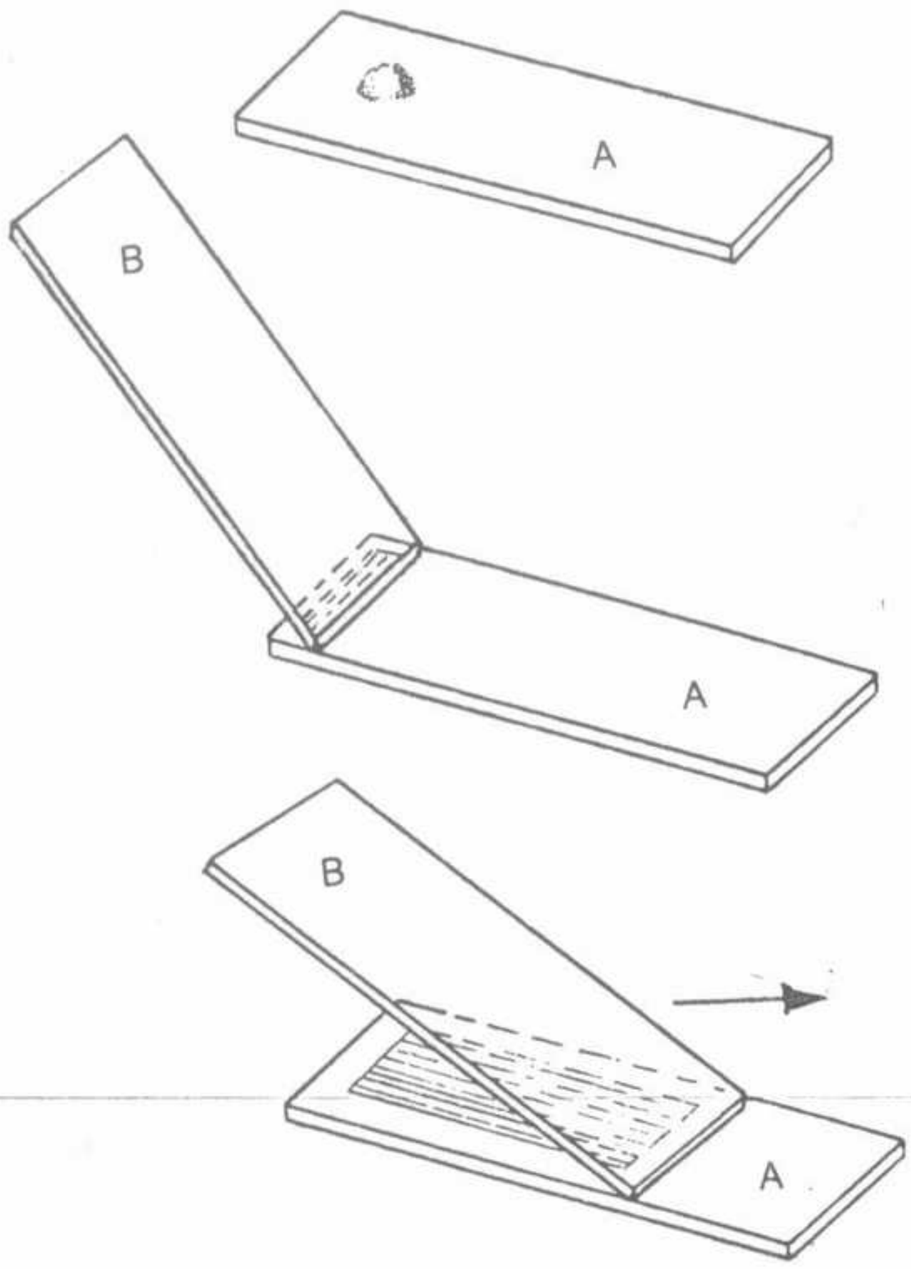


FIG. 130. — *Confección de una extensión.* A, portaobjetos soporte; B, portaobjetos para efectuar la extensión; los tres tiempos del procesado de arriba a abajo.

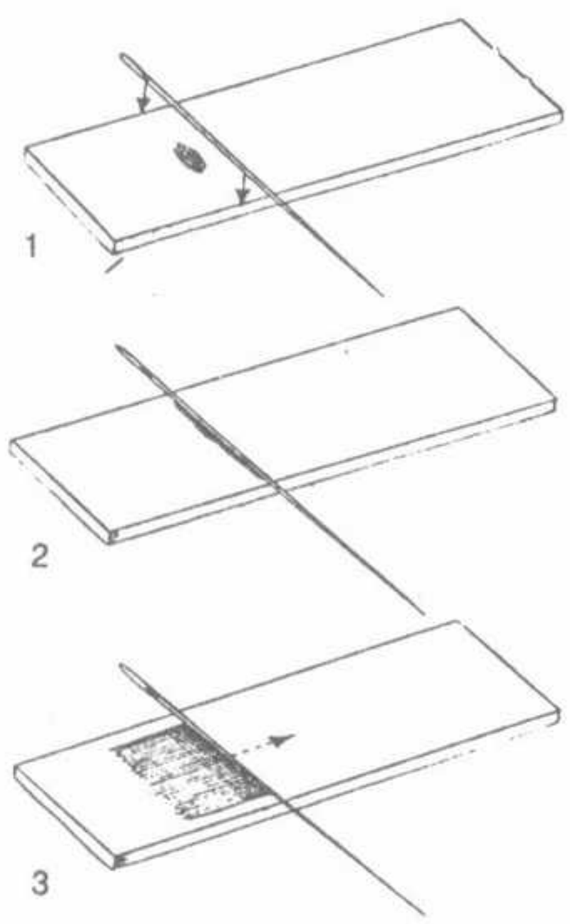


FIG. 131. — *Otro procedimiento para hacer la extensión, con una aguja.* Tres tiempos: 1, 2 y 3.

res: formol, tetróxido de osmio, sin haberlo dejado secar previamente.

Fallos. — Una extensión demasiado gruesa no permite una separación suficiente de las células: reducir el tamaño de la gota; una extensión demasiado fina presenta lagunas y no termina de manera uniforme, dificulta el contaje: aumentar el tamaño de la gota. Si el portaobjetos no está suficientemente limpio la extensión no se efectúa uniformemente. Deben pasarse los portaobjetos en una mezcla sulfocrómica, lavarlos largamente en agua corriente y después en agua destilada y sobre todo no olvidarse de pasarlos por la llama del mechero Bunsen, quemando azul. Este último paso hace que el portaobjetos sea más adhesivo.

Extensiones sobre cubreobjetos. — Para tratar gotas muy diminutas en un lugar de un portaobjetos es suficiente extenderlas en diagonal sobre un cubreobjetos, con otro más pequeño.

Cultivos en gota, en cámara y sobre cubreobjetos. Cuando se desea observar un cultivo de microorganismos durante su desarrollo se pueden emplear tres métodos:

El *cultivo en gota pendiente*, utilizado sobre todo cuando se desean efectuar operaciones con ayuda de un micromanipulador. Las figuras 120 a 122 y 127, ilustran algunas de las manipulaciones que pueden hacerse. Desde el punto de vista óptico es el menos indicado. Efectivamente, se observan las muestras a través del medio de cultivo, lo cual no es muy favorable.

Es mucho mejor emplear microcámaras variadas: figuras 125 y 128. A fin de evitar las contaminaciones en los dos casos debe utilizarse el aceite de parafina para aislar el medio del aire ambiente. Efectivamente, este aceite es permeable al aire pero impermeable a los microorganismos. En el método de la gota pendiente se deposita sobre ésta una gota de aceite y se gira el cubreobjetos; el aceite rodea la gota del medio a observar y se mantiene sobre la misma por tensión superficial. En el segundo caso se sellan las microcámaras con este aceite.

Los cultivos sencillos sobre portaobjetos son los más fáciles de conseguir pero hay el riesgo de las contaminaciones al observarlos. Sin embargo, es el procedimiento escogido cuando con la ayuda de un antibiótico o un bacteriostático se inhiben las contaminaciones. Se logran depositando una gota de medio estéril sobre un portaobjetos estéril, todo ello se recubre por un cubreobjetos y colocado sobre varillas de agitar en el fondo de una caja de Petri estéril en la que se ha depositado un papel de filtro humedecido o arena fina. Para facilitar la aerobiosis del medio es aconsejable cortar la gota de gelosa nutritiva en dos por un surco de varios milímetros de ancho.

• LOS MEDIOS EQUILIBRADOS

(v. tabla XVIII)

El equilibrio puede considerarse desde cuatro puntos de vista:

Isotonía osmótica; isoionía de pH; isopotencial de oxidorreducción; isostasia de oligoelementos.

Líquidos isotónicos osmóticos. — Su composición depende de los organismos que se sitúan en ellos. El mejor de los medios es evidentemente el medio natural: agua de mar, suero sanguíneo, líquido amniótico, líquido sinovial, líquido celómico, etc. Tales medios se reconstruyen artificialmente. Los más frecuentes son:

Agua fisiológica. — Sus concentraciones varían atendiendo los organismos a estudiar; es isotónica con un 0,8 % de ClNa acuoso para animales de sangre caliente; al 0,8 % para las salamandras; a 0,64 % para las ranas; al 1,5-2,6 % para los seláceos.

Líquidos de Ringer. — a) *Para los animales de sangre caliente:*

ClNa:	0,85
ClK:	0,025
Cl_2Ca:	0,03 g
Agua:	100 ml

b) *Para los anfibios:*

ClNa:	0,65
ClK:	0,025
Cl_2Ca:	0,03
CO_3HNa:	0,02 g
Agua:	100 ml

Para esterilizar, filtrar sobre porcelana.

c) *Líquido de Ringer-Locke.*

ClNa: 0,85 para los animales de sangre caliente (y 0,65 para los sangre fría)

ClK:	0,042
Cl_2Ca:	0,025
CO_3HNa:	0,02 g
Agua:	100 ml

d) *Líquido de Tyrode.*

ClNa:	0,8
ClK:	0,02
Cl_2Ca:	0,02
Cl_2Mg:	0,01
$PO\,H_2Na$:	0,005
CO_3HNa:	0,1
Sacarosa:	0,1 g
Agua:	100 ml

Puede incrementarse la presión osmótica aumentando la concentración de fosfato.

e) *Líquido de Pictet.* — Agua + 0,5 al 0,10 % de cloruro de manganeso en agua.

f) *Líquido de Harting.* — Solución saturada de cloruro cálcico diluido en agua de 40 a 80 veces.

Solución tampón a pH fijo. — A todas las soluciones, una vez preparadas se añadirán dos gotas por cada 100 ml de cloroformo para evitar que crezcan mohos. A fin de obtener más fórmulas de las que expondremos a continuación recomendamos que se consulte el Gabe (1968).

a) **Tampón con ácido clorhídrico-fosfato-monosódico** (según Lillie, 1965). — Preparar soluciones N y 0,1 N de ácido clorhídrico, M y 0,1 M de fosfato monopotásico. El cuadro siguiente indica las cantidades a mezclar a fin de obtener el tampón al pH deseado.

ClH ml	*KH_2PO_4 ml*	*pH*	
		1 *M*	0,1 *M*
30	20	0,69	1,53
29	21	0,75	1,56
28	22	0,81	1,63
27	23	0,90	1,66
26	24	0,98	1,71
25	25	1,05	1,77
24	26	1,12	1,80
23	27	1,23	1,84
22	28	1,35	1,89
21	29	1,43	1,94
20	30	1,52	2,00
19	31	1,61	2,05
18	32	1,70	2,10
17	33	1,76	2,15
16	34	1,82	2,23
15	35	1,92	2,27
14	36	2,02	2,31
13	37	2,11	2,38
12	38	2,20	2,44
11	39	2,29	2,50
10	40	2,38	2,56
9	41	2,45	2,63
8	42	2,52	2,70
7	43	2,62	2,79
6	44	2,72	2,89
5	45	2,85	3,02
4	46	3,00	3,14
3	47	3,17	3,23
2	48	3,32	3,44

b) **Tampón a base de borato-ácido bórico de Holmes** (según Lillie, 1965). — Este tampón es particularmente indicado para asegurar la conservación del pH de los reactivos que contienen sales de plata. Las cantidades de borato sódico 0,05 M (19 g/litro) y de ácido bórico 0,2 M (12,4 g/l) a mezclar se indican en la tabla siguiente:

pH	*H_3BO_3 0,2 M ml*	*$Na_2B_4O_7$ 10 H_2O 0,05 M ml*
7,4	18	2
7,6	17	3
7,8	16	4
8,0	14	6
8,2	13	7
8,4	11	9
8,7	8	12
9,0	4	16

c) **Tampón con glicocola-ácido clorhídrico** (según Burstone, 1962). — Se preparan soluciones 0,2 M de glicerina y de ácido clorhídrico: 50 ml de la solución de glicina, a los que se ha añadido *x* ml de ácido clorhídrico, se completan hasta 200 ml para obtener el tampón de pH indicado en la tabla:

pH	*x* .	*pH*	*x*
3,6	5,0	2,8	16,8
3,4	6,4	2,6	24,2
3,2	8,2	2,4	32,4
3,0	11,4	2,2	44,0

d) **Tampón a base de ácido clorhídrico-citrato de sodio** (según Lillie, 1965). — Las soluciones a mezclar son preparadas teniendo en cuenta su grado de hidratación del citrato trisódico y de la densidad del ácido clorhídrico; las cantidades a mezclar para obtener el pH deseado y la molaridad de las soluciones son indicadas en la tabla:

ClH *ml*	*Citrato Na* *ml*	*pH*		
		1 *M*	0,1 *M*	0,01 *M*
50	0	0,25	1,11	2,10
49	1	0,27	1,14	2,15
48	2	0,30	1,19	2,20
47	3	0,35	1,24	2,25
46	4	0,40	1,29	2,30
45	5	0,45	1,34	2,35
44	6	0,51	1,38	2,40
43	7	0,58	1,42	2,45
42	8	0,67	1,50	2,50
41	9	0,80	1,65	2,60
40	10	0,97	1,85	2,70
39	11	1,30	2,12	2,85
38	12	2,00	2,52	3,02
37	13	2,60	2,90	3,24
36	14	2.95	3,24	3,50
35	15	3,25	3,58	3,80
34	16	3,50	3,82	4,03
33	17	3,67	4,00	4,22
32	18	3,84	4,18	4,40
31	19	4,01	4,36	4,60
30	20	4,18	4,52	4,75
29	21	4,30	4,67	4,91
28	22	4,40	4,79	5,05
27	23	4,50	4,90	5,20
26	24	4,59	5,00	5,31
25	25	4,69	5,10	5,42
24	26	4,78	5,20	5,52
23	27	4,85	5,28	5,61
22	28	4,92	5,35	5,70
21	29	5,00	5,41	5,79
20	30	5,05	5,48	5,87
19	31	5,10	5,54	5,93
18	32	5,17	5,60	5,97
17	33	5,22	5,65	6,01

ClH *ml*	*Citrato Na* *ml*	*pH*		
		1 *M*	0,1 *M*	00,1 *M*
16	34	5,28	5,70	6,06
15	35	5,33	5,75	6,10
14	36	5,37	5,79	6,14
13	37	5,42	5,83	6,19
12	38	5,49	5,87	6,25
11	39	5,56	5,93	6,31
10	40	5,63	6,00	6,36
9	41	5,70	6,06	6,42
8	42	5,79	6,14	6,50
7	43	5,88	6,21	6,60
6	44	5,97	6,30	6,69
5	45	6,06	6,39	6,78
4	46	6,16	6,48	6,88
3	47	6,27	6,57	6,98
2	48	6,42	6,73	7,11
1	49	6,66	6,97	7,25
0	50	7,17	7,51	7,82

e) **Tampón de Walpole a base de ácido clorhídrico-acetato sódico, modificado por Pearse (1960) y Lillie (1965).** — Soluciones N de ácido clorhídrico y M de acetato sódico se mezclan siguiendo las indicaciones de la siguiente tabla, siendo el volumen total completado hasta 50 ml con agua destilada *o con otros reactivos;* es esencial respetar esta condición.

ClH 1 *N* *ml*	*Acetato* 1 *M* *ml*	H_2O *ml*	*pH*
20	10	20	0,65
18	10	22	0,75
16	10	24	0,91
14	10	26	1,07
13	10	27	1,24
12	10	28	1,42
11	10	29	1,71
10,7	10	29,3	1,85
10,5	10	29,5	1,99
10,2	10	29,8	2,32
10,0	10	30	2,64
9,95	10	30,05	2,72
9,7	10	30,3	3,09
9,5	10	30,5	3,29
9,25	10	30,75	3,49
9,0	10	31	3,61
8,5	10	31,5	3,79
8	10	32	3,95
7	10	33	4,19
6	10	34	4,39
5	10	35	4,58
4	10	36	4,76
3	10	37	4,92
2	10	38	5,20

f) **Tampón de Walpole a base del ácido acético-acetato sódico** (según Lillie, 1965). — Soluciones de los dos compuestos de molaridad deseada, se mezclan siguiendo las indicaciones de la tabla siguiente:

Ácido acético ml	*Acetato de sodio ml*	0,2 *M* *pH*	0,01 *M* *pH*
20,0	0,0	2,696	3,373
19,9	0,1	2,804	3,420
19,8	0,2	2,913	3,477
19,7	0,3	2,994	3,503
19,6	0,4	3,081	3,523
19,5	0,5	3,147	3,534
19,4	0,6	3,202	3,590
19,2	0,8	3,315	3,593
19,0	1,0	3,416	3,647
18,5	1,5	3,592	3,737
18,0	2,0	3,723	3,863
17,0	3,0	3,900	3,980
16,0	4,0	4,047	4,110
15,0	5,0	4,160	4,223
14,0	6,0	4,270	4,337
13,0	7,0	4,360	4,473
12,0	8,0	4,454	4,527
11,0	9,0	4,530	4,600
10,0	10,0	4,626	4,717
9,0	11,0	4,710	4,807
8,0	12,0	4,802	4,910
7,0	13,0	4,900	5,000
6,0	14,0	4,990	5,077
5,0	15,0	5,110	5,183
4,0	16,0	5,227	5,373
3,0	17,0	5,380	5,500
2,0	18,0	5,574	5,713
1,0	19,0	5,894	6,003
0,5	19,5	6,211	6,227
0,0	20,0	6,518	6,777

g) **Tampón universal al veronal sódico-acetato sódico según Michaelis (1931).** — El interés esencial de este tampón es la constancia del nivel de sales, la ausencia de iones de valencia superior a 1 y la ausencia de toda acción precipitadora sobre el calcio.

La solución madre contiene acetato sódico M/7 (9,714 g/500 ml) y del veronal sódico M/7 (14,714 g/500 ml). Cinco ml de esta solución madre se añaden *n* ml de ácido clorhídico 0,1 N y en el caso extremo (cuando se desea obtener un líquido isotónico) de 2 ml de solución de cloruro sódico al 8,5 % en todos los casos el volumen debe completarse a los 25 ml con agua destilada hervida. Los valores de *n* están indicados en la tabla siguiente:

pH	*n ml ClH* 0,1 *N*
9,16	0,25
8,90	0,5
8,68	0,75
8,55	1
8,18	2
7,90	3
7,66	4
7,42	5,0
7,25	5,5
6,99	6,0
6,75	6,5
6,12	7
5,32	8
4,93	9
4,66	10,0
4,33	11,0
4,13	12,0
3,88	13,0
3,62	14,0
3,20	15,0
2,62	16,0

Los valores intermedios entre los que figuran en la tabla pueden ser determinados por interpolación lineal. El pH de 5 ml de solución madre, diluidos, con o sin adición de cloruro sódico, pero sin adición de ácido clorhídrico, a 25 ml es de 9,64, pero el poder tamponador de este líquido es evidentemente débil.

OSMODIÁLISIS

Cuando se observan células vegetales en vivo se constata a menudo la presencia de vacuolas pigmentadas. Cuando el pigmento es diluido puede ser muy poco visible. Para intensificar su visibilidad se puede recurrir a un artificio: la *osmodiálisis*, término que preferimos al de la *plasmólisis*. Las células son sumergidas en una solución azucarada concentrada. La diferencia de presión osmótica provoca una salida de agua de la célula; las vacuolas se contraen y se concentran, con lo que se hacen más visibles los pigmentos vacuolares. Los otros pigmentos: de membrana, necropigmentos, incrustantes, etc., no son afectados por esta osmodiálisis.

V. — TÉCNICAS ESPECIALES

PREPARACIONES DELGADAS POR PULIMENTO O DESGASTE

La obtención de preparaciones delgadas no es únicamente útil en mineralogía y petrología, es indispensable en micropaleontología de rocas metamórficas, así como siempre que se desee observar estructuras cargadas de minerales, como en el caso de los hursos o maderas fósiles sin que previamente se someta el material a una desmineralización.

El procedimiento se efectúa en tres etapas: serrar, pulimentación de la superficie cortada, pegado sobre el portaobjetos y pulimentación de la otra cara del fragmento, a la vez que por desgaste se alcanza el grosor deseado.

El aserrado se hace en seco o con agua, tras haber eventualmente englobado el material en una resina, procedimiento adecuado en el caso de los objetos porosos.

Para el pegamento de la muestra puede emplearse el bálsamo del Canadá seco y endurecido, colocado en el centro del portaobjetos que se va calentando paulatinamente hasta su total fusión. La cara pulimentada se deposita sobre la gota, contra el vidrio.

Tras dejar enfriar bajo una presión este portaobjetos será nuevamente pulimentada al día siguiente por su otra cara, siguiendo la misma técnica, y posteriormente montada con bálsamo del Canadá colocando un cubreobjetos.

El pulimentado se hace mediante polvo de carburundo de tres grosores sucesivos y seguidamente con polvo de esmeril sobre una plataforma giratoria de vidrio suavizado.

En lugar del bálsamo del Canadá puede utilizarse una solución de resina Copal (G. von Koch, 1878) en cloroformo, lográndose que tenga una consistencia de jarabe por evaporación a color suave. Tras enfriamiento, la resina no se debe poder rayar con la uña.

Una mezcla de colofonia: 10 partes + 1 parte de cera de abeja, ha sido utilizada con éxito por Ehrenbaum.

Puede ser ventajoso utilizar algunos reactivos descalcificantes o diversos colorantes para diferenciar estructuras, antes de colocar el cubreobjetos.

La réplica. — En lugar de pulimentar la segunda cara, según Walton se puede atacar la primera superficie pulimentada con ClH, lavar con agua abundante, dejar secar y depositar una capa de colodión disuelto en acetato de amilo. Tras el secado de esta película se arranca con precaución y posteriormente se monta con la cara que ha estado en contacto con la superficie hacia arriba, entre porta y cubreobjetos. Al arrancar la película se arrastran los microfósiles superficiales.

Si la roca es silícea solamente se sustituye el ClH por FH.

DISOCIACIONES

Para preparar los elementos que integran un tejido o un órgano sin destruir ciertos contactos mecánicos se practica la disociación. Es particularmente interesante en histología vegetal y para el estudio de mohos y hongos, esta técnica no sustituye la de obtención de cortes, se trata de una técnica complementaria.

Para lograr la disociación se puede recurrir a diversos procedimientos: mecánicos, ultrasonidos y químicos.

Disociación mecánica. — Se coloca el material entre dos portaobjetos o entre porta y cubreobjetos en un medio líquido adecuado. Efectuando repetidos golpecitos sobre el vidrio superior, con un mango de madera o con un fragmento de goma montada sobre una aguja enmangada de madera se disocian progresivamente las células que forman el tejido; hay que comprobar de vez en cuando los resultados al microscopio antes de proseguir. Cuando la disección se hace entre dos portaobjetos una vez que haya terminado la disociación se sustituye una de ellas por el cubreobjetos.

Disociación mediante ultrasonidos. — Un tren de ondas estacionarias ultrasónicas produce en un líquido frentes de vibración acompañados de considerables variaciones locales de presión bastante considerables, de ahí su efecto disgregador potente a escala celular. De ahí también la necesidad de regular la longitud de onda utilizada para obtener los efectos deseados sobre estructuras de dimensiones variadas, previamente colocadas en suspensión en un medio líquido neutro tal como el agua, la glicerina, el alcohol o en un medio activo. Se utiliza para separar orgánulos citoplasmáticos (Bessis y Locquin) o para romper membranas y cubiertas de células de gran tamaño como los granos de polen y las esporas (Cerceau y colaboradores).

Disociación química. — Cuando las células que integran un tejido están unidas entre sí por un mucílago se pueden separar disolviéndolo. Generalmente se utiliza una enzima específica muy diluida, siempre preferible a la utilización de agentes químicos más enérgicos si se quiere mantener vivas las células. Las colonias bacterianas como los seudoplasmodios de las Acrasiales se disocian frecuentemente variando simplemente el pH del medio o su presión osmótica.

Para muestras más resistentes se utilizará:

Alcohol al tercio de Ranvier: Etanol de 96°: 30 % acuoso, dejar actuar de 12 a 24 h. Pasar por ácido ósmico al 0,5 % durante 1 a 2 h, lavar y disociar.

Fluoruro sódico en solución acuosa al 1 o 2 %: 3 a 4 h; es muy enérgico.

Ácido acético de 0,2 al 2 % acuoso. La maceración química siempre debe ir seguida de una débil disociación mecánica, como la señalada anteriormente. (Consúltese la «Maceración», página 132.)

Digestión enzimática. — Pepsina clorhídrica: del 1 al 5 % en ácido clorhídrico al 2 % + un cristal de timol, trabajar a 37-40°.

Pancreatina sódica: 0,2-0,5 % en sosa al 0,2 % + un cristal de timol, trabajar de 37 a 40°.

PREPARACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SEDIMENTOS

En micropaleontología y en ocasiones en palinología, pueden separarse las muestras que interesa estudiar de su ganga mineral. La muestra debe ser triturada en partículas del orden de un milímetro. Esta trituración debe hacerse no con un mortero sino por presión. Seguidamente, se tamiza para eliminar las partículas más groseras. El sedimento será entonces disuelto en un considerable volumen de ácido clorhídrico, tras su decantación y lavado con agua, se someterá a la acción del ácido fluorhídrico, en el caso de que contenga sílice. El ácido clorhídrico puede ser ventajosamente sustituido por el ácido fórmico. Tras un lavado se decanta, o se centrifuga, o se filtra sobre microporos. Seguidamente, el sedimento se somete a suspensión en un líquido denso, compuesto por una mezcla de cromoformo, de gravedad específica de 2,9 y de etanol, 0,8 (43 %), la mezcla tiene 2 de gravedad específica. Previamente se había deshidratado el sedimento con etanol. El sobrenadante que contiene todas las estructuras orgánicas es retirado, lavado con etanol, rehidratado y, si conviene, teñido, como si se tratara de material biológico actual. El montaje final se hará preferentemente en un medio hidrosoluble.

DESTRUCCIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA, SALVO LAS ESPORAS Y LOS GRANOS DE POLEN

El método de Post (1933) es el más sencillo. La potasa solubiliza los ácidos húmicos pigmentados que determinan la opacidad de las muestras al microscopio. Puede utilizarse la potasa al 10 %, en frío, durante varias horas o en caliente hasta que se evapore. Si la acción de la potasa es débil puede incrementarse su concentración.

Van Campo (1950) utiliza una mezcla de sosa y perborato. Este método tiene la ventaja de concentrar los granos de polen y las esporas, dado que únicamente solubiliza la materia húmica no figurada. El sedimento se somete a ebullición en una solución de sosa al 10 % a la que se le han añadido unas trazos de perborato sódico: $B_4O_8Na_2$. En una variante de este método, sólo se añade el perborato sódico al final del procesado de la muestra. Tras el tratamiento del material se lava, se centrifuga y se monta entre porta y cubreobjetos.

SEPARACIÓN POR CRISTALIZACIÓN

Wicher y Schwartz mezclan el sedimento con una solución concentrada de potasa y sosa cáustica. Se calienta hasta ebullición, durante varias horas. Seguidamente se añade una solución saturada de sulfato de sodio. Se deja enfriar la mezcla y ésta cristaliza. Se calienta nuevamente y se deja enfriar, a fin de poder hacer una disociación mecánica. Se lava con abundante agua. De esta manera, se pueden disgregar fácilmente las rocas del tipo de los esquistos.

PREPARACIÓN DE LIGNITOS

El mejor método es el de Thiergart, a base de ácido nítrico. Se utiliza un matraz de litro en el que se ponen 50 ml de agua y 50 ml de ácido nítrico, más el sedimento. Se agita durante un día y se termina de llenar el matraz hasta un litro. Se centrifuga y el sedimento se lava con agua. El tratamiento termina añadiendo un 7 % de potasa fría o caliente y centrifugando de nuevo.

PREPARACIÓN DE CARBONES

Se sigue el método de Schultze (1855). Al sedimento groseramente triturado se le añade una cantidad igual a su volumen de cloruro potásico y seguidamente ácido nítrico. El oxígeno desprendido oxida el carbón y el cloro oxida los componentes pigmentados, respetando las esporas y los granos de polen que pueda contener la muestra.

El tiempo de actuación de este reactivo es muy variable, depende del tipo de carbón a estudiar. El tratamiento termina por una centrifugación, previo lavado de la muestra.

El método de Zetsche y Kälin (1932) utiliza el bromo, el de Langerheim (1902), el ácido oxálico o el ácido crómico y el de Bertsch (1952) utiliza una mezcla de ácido crómico-ácido sulfúrico. Se consultará la literatura especializada para los asfaltos y betunes, a fin de obtener más detalles metodológicos.

PREPARACIÓN DE GRANOS DE POLEN A PARTIR DE ACEITES, ASFALTOS Y BETUNES

Inicialmente deben licuarse las muestras con la mezcla formada por un 70 % de benceno + 15 % de metanol + 15 % de acetona. Se centrifugan 5 o 10 litros de esta mezcla. Se recoge el precipitado, se vuelve a suspender en un diluyente y se vuelve a repetir la operación hasta el completo aclaramiento del sobrenadante y se hace un último lavado con etanol. Finalmente, se lava con agua, después con ácido clorhídrico, fluorhídrico y después con potasa o con cualquier mezcla oxidante. El residuo final puede teñirse previo montaje.

LOS INTENSIFICADORES DE CONTRASTE

Se trata más bien de «incrementadores del índice» por fijación de átomos pesados sobre las estructuras a observar, sin intervención cromática. Han surgido principalmente de los estudios en microscopia electrónica, pero pueden prestar grandes servicios en microscopia fotónica interferencial o en contraste de fases.

Fijadores-intensificadores. — Todos los fijadores que contienen metales pesados que intensifican los contrastes: osmio, cromo, manganeso, platino son los principales metales incorporados a su molécula.

Colorantes intensificadores. — Los *ácidos fosfotúngsticos* y *fosfomolíbdicos* en solución alcohólica al 1 % son los más frecuentemente utilizados.

Los *proteinatos de plata:* En microscopia fotónica es la impregnación negra la útil mientras que en microscopia electrónica es el aumento de masa el que cuenta.

El *cloruro férrico,* el *acetato de uranilo,* el *nitrato de lantano* propuestos por Locquin en 1955, el *nitrato de talio* han sido igualmente utilizados así como las *sales de plomo,* el *permanganato potásico,* el *estanato de cobalto,* el *cloruro de rutenio.*

Algunos colorantes orgánicos pueden ser asimismo utilizados por contener en su molécula algunos átomos pesados como lo ha demostrado Locquin en 1955. Entre los más importantes cabe destacar: *Verde naftol, verde de etilo, eosina azulada, pinacianol, floxina azulada, eritrosina amarillenta, floxina, etileosina, mercurocromo* (mercromina), *rosa Bengala, eritrosina azulada, azul de resorcina, gallocianina-cromalumbre, gallocianina indio-alumbre, azul de bromofenol mercúrico.*

El *tanato de hierro* (Locquin, 1943) es utilizado para la diferenciación de membranas. Se trata el material sucesivamente con una solución acuosa concentrada de tanino y después con una solución de cloruro férrico al 3 %.

El *bisulfuro de antimonio* (C. A. Baud, 1943) aparte de sus propiedades de birrefringencia (cf. página 50), aumenta considerablemente los contrastes de las estructuras sobre las cuales se fija, tanto en microscopia fotónica como en microscopia electrónica.

DESECACIÓN, DESHIDRATACIÓN

Es indispensable cuando se desea incluir muestras en parafina o en celoidina, pasando por intermediarios aclarantes que no toleran el agua.

La **termodesecación** se utiliza casi exclusivamente para las extensiones, antes de llevar a cabo la fijación, para los insectos que no quieran fijarse y para las plantas y hongos destinados a ir en herbarios. Una temperatura moderada, una ventilación y pequeñas piezas son tres condiciones esenciales para el éxito del procesado. También puede colocarse el objeto en un frasco con un agente deshidratante, como pueda ser el silicagel.

La **criodesecación** utiliza el frío para evitar contracciones u otras deformaciones de los objetos. El agua es eliminada por sublimación tras congelación a baja temperatura (–50° a –70°). Para asegurar una buena conductibilidad térmica y un enfriamiento rápido de la pieza, se utilizan líquidos como la glicerina, el glicol, el isopentano, el pentano, una mezcla propano-pentano. Todos estos líquidos son enfriados exteriormente al vaso que los contiene por nitrógeno líquido que formaría mezclas explosivas con los hidrocarburos. Los hidrocarburos se evaporan a continuación sin dejar trazas, mientras que la glicerina y el glicol son más difíciles de eliminar. La eliminación del agua se hace bajo el vacío variable en función de la temperatura: de 0,77 Torr a 0,007 T, según se trabaje a –20° o –60°.

Para llevar a cabo una buena criodesecación en estas condiciones se requiere un utillaje especial y costoso. Cuando no se dispone del instrumento especial pero sí se tiene un congelador se procede de la siguiente manera:

Se congela lo más rápidamente posible la muestra a baja temperatura en el congelador o con nieve carbónica. Una vez congelada se coloca en un gran recipiente, con una gran cantidad de silicagel recubriéndola, después se coloca nuevamente la muestra a un frío más suave aunque siempre por debajo de 0°. La evaporación del hielo tarda de uno a varios meses.

La sustitución en fase líquida. — Consiste en sumergir el objeto en sucesivos baños en un reactivo que sea muy hidrosoluble y a la vez que sea miscible con el medio de inclusión que se utilizará posteriormente.

El método del punto crítico de Anderson (1951) se basa en la bien conocida propiedad física del punto crítico, por encima del cual se puede pasar del estado líquido al estado gaseoso sin una interfase desorganizadora de las microestructuras. Anderson utiliza el CO_2 líquido cuya temperatura crítica es de 31° a 73 bar.

DESHIDRATACIÓN EN UN MEDIO LÍQUIDO

Esta deshidratación debe ser total si se utilizan hidrocarburos bencénicos como agentes aclarantes; antes de la inclusión puede lograrse una eliminación de agua del orden del 95 % si se utiliza el *tricloroetileno* o productos análogos citados en la página 147.

Todavía se utilizan numerosas prácticas inútiles: como las de la pretendida necesidad de pasar por baños sucesivos de alcoholes de graduación creciente o el empleo del alcohol absoluto (etanol) para esta deshidratación. Se emplearán frascos de Borrel con prisma triangular para deshidratar tres portaobjetos simultáneamente (fig. 132).[1] Preferibles al alcohol son:

La **acetona:** miscible en agua y en parafina. Debe ser totalmente anhidra, se conserva con un poco de sulfato sódico o sulfato de cobre anhidro o carburo de calcio.

El **metanol** o **alcohol metílico**, mucho menos higroscópico que el etanol.

El **xilol-creosota fenicada:** Xilol o toluol 80 ml + creosota 10 ml + ácido fénico 10 g. Muestras procedentes del alcohol de 95° que pueden pasar directamente a esta mezcla evitan la contracción de objetos blandos.

El **benceno fenicado:** para lograrlo se ha de saturar con fenol benceno a temperatura ambiente.

La **dimetilformamida** (Klima, 1958).

El **alcohol butílico terciario** se funde a temperaturas templadas y permite el paso directo a la parafina con un baño intermediario de parafina disuelta en este alcohol.

El **alcohol amílico** tiene las mismas propiedades que el butílico terciario, pero no es higroscópico.

El **alcohol isopropílico**, como el anterior.

El **dioxano**, soluble en agua y en parafina, no requiere el paso a través de ningún intermediario, pero es tóxico.

El **metilal** tiene las mismas propiedades que el dioxano.

El **cellosolve** es miscible en agua, en benceno y en aceite de cedro; se trata del monoetil éter de etilen glicol.

Los tiempos de deshidratación varían atendiendo a las dimensiones de la pieza y a la velocidad de penetración del reactivo. Únicamente pueden fijarse los tiempos tras ensayos previos. En general, bastan una a varias horas para objetos del orden del mm^3 y varios días para piezas de gran tamaño.

Siempre es preferible una serie de baños sucesivos con líquido renovado a un solo baño en un gran volumen de reactivo.

En los capítulos dedicados a los métodos de inclusión encontrarán nuestras técnicas preferenciales, ya que la compatibilidad entre los reactivos intermediarios y el medio de inclusión tienen una gran importancia.

La deshidratación-aclaramiento automáticos. Para las piezas pequeñas y sobre todo para los bloques de preinclusión en gelosa o en gelatina, ante la perspectiva de una doble inclusión gelatina o gelosa-parafina, se pueden automatizar los dos tiempos de la siguiente manera: en un tubo se

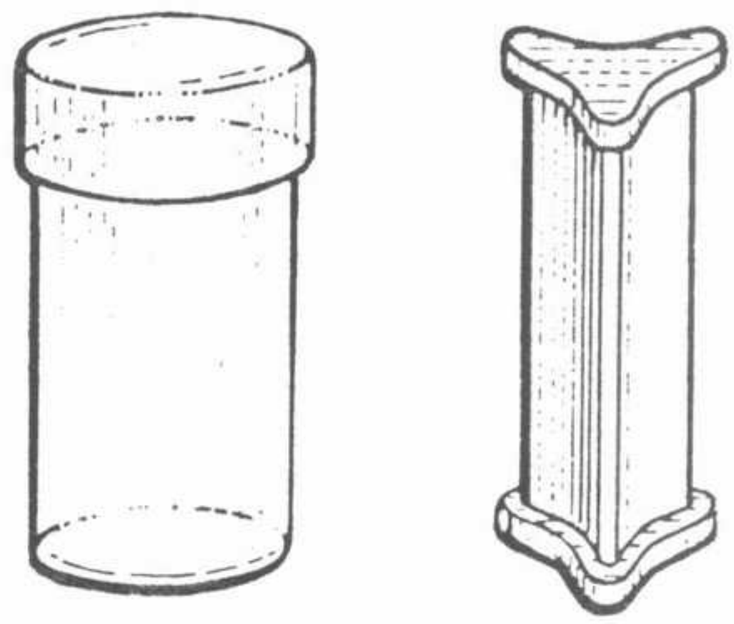


FIG. 132. — *Tubo o frasco de Borrel y su prisma, que permite tratar tres portaobjetos simultáneamente.* Documento Prolabo, París.

1. Al igual que la mayoría de autores la traductora no está de acuerdo en este punto con Locquin y Langeron, y considera que al trabajar con alcohol etílico o isopropílico debe pasarse la muestra por una serie de alcoholes de graduación ascendente. Para materiales especiales, tales como gónadas femeninas, es preferible utilizar otros agentes intermediarios como el alcohol butílico terciario. *(N. de la T.)*.

colocan unos centímetros de esencia de cedro o esencia de girasol, encima de los cuales se vierte con precaución, para no mezclarse, alcohol de 95°. El objeto se coloca en éste, flotando sobre la esencia y no penetrando en ella hasta que ha alcanzado una total deshidratación, entonces se traslada en esencia de cedro o de girasol pura, y finalmente en la parafina que puede albergar algo de esencia, para pasar finalmente a parafina pura.

REACTIVOS ACLARANTES DESALCOHOLIZADORES

Entre el reactivo empleado en la deshidratación y la inclusión, es imprescindible eliminar el alcohol para aclarar el objeto que con anterioridad era opaco y de esta manera permitir una buena penetración del medio de inclusión. Desde hace mucho tiempo, el toluol y el xilol han sido los más utilizados. Esta preferencia no era justificada. Se ha reconocido que el benceno, menos caro, era superior a ambos. Pero todos los hidrocarburos adquieren una tonalidad lechosa en el caso de introducir un material que no esté perfectamente deshidratado. Es por lo que actualmente los microscopistas tienden a prescindir del alcohol absoluto por ser demasiado higroscópico, y utilizan en la deshidratación la acetona o el dioxano (cf. pág. 146) o bien prefieren escoger reactivos aclarantes que admitan una pequeña dosis de agua como:

El tricloroetileno: no inflamable, disuelve la parafina miscible en alcohol de 95°, y con todos los alcoholes: amílico, butílico, metílico, acetona, e incluso con la esencia de cedro.

La esencia de madera cedro (no debe confundirse con el aceite que lleva el mismo nombre) soporta la deshidratación con alcohol de 95°, es miscible con la parafina.

El dioxano: soluble en el agua y en la parafina, en bálsamo y en hidrocarburos bencénicos. Sus vapores son tóxicos por acumulación, lo que convierte en muy delicada su utilización.

El metilal: soluble a la vez en agua y en parafina.

El benzoato de metilo: es a la vez un deshidratante de complemento tras la deshidratación por la serie de alcoholes y un medio de montaje líquido y un líquido de inmersión, con un índice de refracción del orden de 1,517. Puede utilizarse asimismo como agente intermediario de la parafina, pero preferentemente con un intermediario bencénico.

El cellosolve es un mono-etil-éter de etilen glicol, miscible en el agua, en los reactivos bencénicos y en aceite de cedro.

La esencia de girasol admite los materiales deshidratados en alcohol de 74°. Es miscible en colodión y en parafina.

La esencia de bergamota admite los objetos deshidratados en alcohol de 95°, es miscible en celoidina.

El terpinol admite objetos que provengan de alcohol de 80°, es miscible en benceno

El aceite de anilina admite muestras que salen del alcohol de 75°. No debe usarse tras una fijación a base de osmio.

Cloroformo: excelente pero es poco penetrante.

Xilol fenicado: xilol saturado de fenol a temperatura ambiente. Recomendado en climas extremadamente húmedos.

Sulfuro de carbón.

Gaiacol (cf. pág. 315).

REACTIVOS DESHIDRATANTES QUE PERMITEN PASAR DIRECTAMENTE A LA PARAFINA

Acetona que se mantiene anhidra mediante carburo de calcio.

Alcohol butílico terciario.

Dioxano, precaución con los vapores tóxicos.

Metilal, no debe confundirse con el metanal o con el formol.

Cellosolve: mono etil éter etilen glicol.

REACTIVOS ACLARANTES QUE PERMITEN PASAR DEL ETANOL DE 95° A LA PARAFINA

Tricloroetileno, el mejor de todos y el más económico.

Esencia de girasol, ver su utilización en automático página 146.

Xilol-creosota fenicada: saturar con fenol una mezcla de xilol + creosota a partes iguales.

Benzoato de metilo.

Esencia de bergamota.

Aceite de anilina.

VI. — LOS MÉTODOS DE INCLUSIÓN

MEDIOS DE INCLUSIÓN NO ACUOSOS

La parafina es el medio más utilizado, puede emplearse sola o mezclada con otros productos que mejoran sus propiedades mecánicas. Se encuentran en el comercio toda una gama de parafinas caracterizadas por sus puntos de fusión. Las parafinas blandas funden a 35°, las semiduras entre 50 y 65°, las duras por encima de los 70°. Los puntos de ablandamiento se sitúan en general unos 5° por debajo de los puntos de fusión.

La celoidina o colodión o parlodión es una solución de nitrocelulosa en un disolvente apropiado. Es altamente inflamable y explota con los golpes o con el calor. Es por ello que deben tomarse precauciones al utilizarla. Su gran ventaja con respecto a la parafina es por el hecho de que no provoca retracciones y permite obtener cortes de materiales mucho más duros.

El esterwax es una mezcla que funde a 48° (véase su composición en la página 152), corrosivo de metales, admite materiales procedentes del benceno con un intermediario obligatorio del esterwax disuelto en benceno.

Las resinas epoxi. — Las dos más utilizadas son: el epon y el metacrilato, utilizados tanto en microscopia electrónica como en microscopia fotónica. El proceso es largo y complejo y únicamente se aplica a pequeños objetos colocados en una cápsula de gelatina.

MEDIOS DE INCLUSIÓN ACUOSOS

Gelatina: frecuentemente pura o glicerinada.

Gelosa: preferible a la gelatina.

Jabones.

Resinas epoxi: algunas como el hidroxietil metacrilato.

Polietilen glicol: Aquax.

Goma de cerezo plúmbica.

Goma arábiga, solución acuosa o glicerinada.

Shellac.

Gel de sílice (cf. pág. 172).

INCLUSIÓN EN PARAFINA

Una vez finalizada la fijación, y convenientemente lavados los objetos a incluir, se recomienda situarlos en un tubo con el fondo agujereado y cerrarlo con un tapón nuevo, a fin de hacer flotar el conjunto, o bien utilizar tubos estrangulados, o con el borde cerrado por un tul sólidamente atado al fondo.

Deshidratación. — En el capítulo anterior hemos citado todos los métodos de deshidratación: termodesecación, criodesecación, sustitución en fase líquida y método del punto crítico.

La **sustitución en fase líquida** es el método más utilizado. Entre los sustituyentes: el *etanol absoluto* ha tenido durante más de un siglo un lugar privilegiado que no tiene justificación. Es preferible deshidratar con etanol de 96° y después pasar al **tricloroetileno** más que el alcohol absoluto. También puede pasarse del alcohol de 96° al *alcohol butílico terciario,* a una temperatura de 40°, al *alcohol amílico,* al *isopropílico* o al *metanol.* El paso por baños sucesivos de 50, 60, 75, 95° no es imprescindible, ya que la cantidad de agua que contiene la muestra es suficiente para diluir el etanol de 96° y pasarlo a varios grados inferiores, es siempre conveniente emplear de 3 a 9 baños sucesivos en alcohol de 96°, atendiendo a las dimensiones de la pieza a la vez que se va agitando, o colocarla hacia la mitad del frasco o del tubo, ya que la mezcla éter-etanol es más pesada y se acumula en el fondo.

La deshidratación con *dioxano* presenta numerosas ventajas, pero la toxicidad de sus vapores obliga a tener que trabajar bajo campana de gases o al aire libre, a la vez que debe utilizarse una estufa con evacuación forzada de gases.

La deshidratación con *acetona* está lejos de ser nuestra preferida. Para que la acetona sea totalmente anhidra debe colocarse una pequeña cantidad de carburo cálcico en el fondo de cada frasco. En contacto con el agua se desprende acetileno, asimismo debe colocarse un tubo capilar atravesando el tapón para que se vaya eliminando y se *debe evitar abrir el frasco en las cercanías de la llama del mechero.* El típico olor a ajo del acetileno permite apreciar su desprendimiento y de esta manera poder verificar si la acetona es totalmente anhidra. Sin pasar por ningún otro agente intermediario se colocan directamente las muestras en una cesta o tubo perforado sumergido en la acetona y se renueva cuatro o cinco veces o inclu-

so mejor se deja un trozo de carburo cálcico a fin de que vaya descomponiendo el agua a medida que sale de las muestras tisulares. Se aprecia el final de la deshidratación cuando cesa el desprendimiento de acetileno: ausencia de olor a ajos. Dado que la acetona anhidra es miscible con la parafina, puede prescindirse de las etapas de eliminación del agente intermediario, lo que representa una considerable ganancia de tiempo.

Desalcoholización-aclaramiento. — Deben considerarse varios casos:

1.° *El objeto procede del alcohol absoluto:* utilizar esencia de cedro, el tricloroetileno, el sulfuro de carbono, el benceno, la esencia de girasol, el cloroformo. (La relación mencionada es de mejor a peor.)

2.° El objeto procede de la acetona, de los alcoholes butílico, amílico, isopropílico, del dioxano: se puede pasar directamente a la parafina.

3.° El objeto procede del etanol o del metanol de 95-96°: pasarlo por el tricloroetileno.

Si el material es de reducidas dimensiones y está incluido en gelatina o en gelosa puede utilizarse el método automático: etanol de 95° - esencia de girasol descrito en la página 146.

Nuestras preferencias recaen en:

a) *Para piezas de gran tamaño:* la deshidratación con etanol de 95° seguido de un aclaramiento con el tricloroetileno.

b) *Para las piezas medianas:* la deshidratación con acetona que lleve incorporada al carburo cálcico y pasar directamente a la parafina.

c) *Para piezas diminutas:* la deshidratación-aclaramiento automáticos: etanol + esencia de girasol.

Impregnación con parafina. — Para obtener una masa homogénea que constituya un bloque único con la piezas a estudiar y pueda cortarse bien, es imprescindible hacer una buena inclusión, es decir, debe penetrar bien la parafina y ello se logra trabajando a una temperatura ligeramente superior a su punto de fusión; generalmente se pasa el material por un primer baño, que será de parafina disuelta en el líquido de donde proviene la muestra: esencia de cedro, tricloroetileno, sulfuro de carbono, benceno, acetona, alcoholes butílico, amílico, isopropílico, dioxano; se dejará la pieza en esta mezcla a la estufa a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión de la parafina utilizada, hasta que se elimine totalmente el disolvente; esto puede durar de 24 h a tres días, no debe dudarse en alargar el tiempo.

Si las piezas no son demasiado voluminosas puede omitirse este baño si procede del tricloroetileno, de la acetona o del dioxano. Sin embargo, deben hacerse ensayos atendiendo a la naturaleza de las muestras. Puede acelerarse la penetración al trabajar en un vacío moderado provocado por una tromba de agua que elimine los gases de los tejidos. Este segundo baño será en parafina pura, durante un tiempo similar al anterior.

Conservación del bloque. — Nunca deben guardarse los bloques vírgenes de parafina en un laboratorio donde se manejen disolventes de la misma, ya que podrían impregnarse de dichos reactivos, los bloques tendrían una consistencia heterogénea y estropearíamos las inclusiones.

Confección del bloque. — Hay cuatro métodos de moldeado de los bloques de parafina actualmente utilizados y todos ellos presentan inconvenientes de orden práctico.

El primer método consiste en emplear moldes de papel o de hoja de aluminio adaptados a las piezas que deban incluirse. El tiempo invertido en la confección de estos moldes es importante y debe tenerse en cuenta que no son recuperables.

Para la obtención de los moldes se procederá como se indica en la figura 133. El papel corriente de 80 g/m^2 es igualmente adecuado que las hojas de aluminio de 0,33 mm de grosor.

El segundo método consiste en utilizar pequeños recipientes como puedan ser cápsulas de cinc, de gelatina o de plástico, cápsulas de Petri, vidrios de reloj de fondo plano, etc. En este caso también, la elección y el número de estos posibles moldes constituyen una considerable pérdida de tiempo y su manejo no es nada cómodo, a la vez que sacar los bloques del molde utilizado es dificultoso y ofrece bloques irregulares que no facilitan en absoluto las operaciones siguientes.

El tercer método consiste en utilizar las barras o pinzas de Leuckart, escuadras metálicas que encajadas al revés dan lugar a un molde que tiene dimensiones variables de longitud y en diámetro. Cuando eventualmente, deben hacerse muchas inclusiones se requieren evidentemente numerosas pinzas de Leuckart cuyo manejo es poco cómodo y bastante engorroso. Además, la inclusión y orientación de piezas muy diminutas es realmente difícil, dada la altura invariable de estas escuadras. Finalmente, se tiene el riesgo de «perder» las piezas pequeñas y transparentes en una cantidad excesiva de parafina (fig. 134).

En la cuarta técnica los moldes son cubiletes de plástico empleados en las neveras para hacer los «cubitos» de hielo. El tener que utilizar escalpelos u otros objetos cortantes que deben usarse para extraer el bloque del molde presentan un doble peligro; uno eventual de estropear la pieza incluida y evidentemente el de estropear rápidamente los moldes; resisten mal el manejo del escalpelo y el calor desprendido por la parafina.

Las mejoras aportadas por J. Rebière subsanan los inconvenientes indicados en las técnicas anteriormente descritas, empleando moldes me-

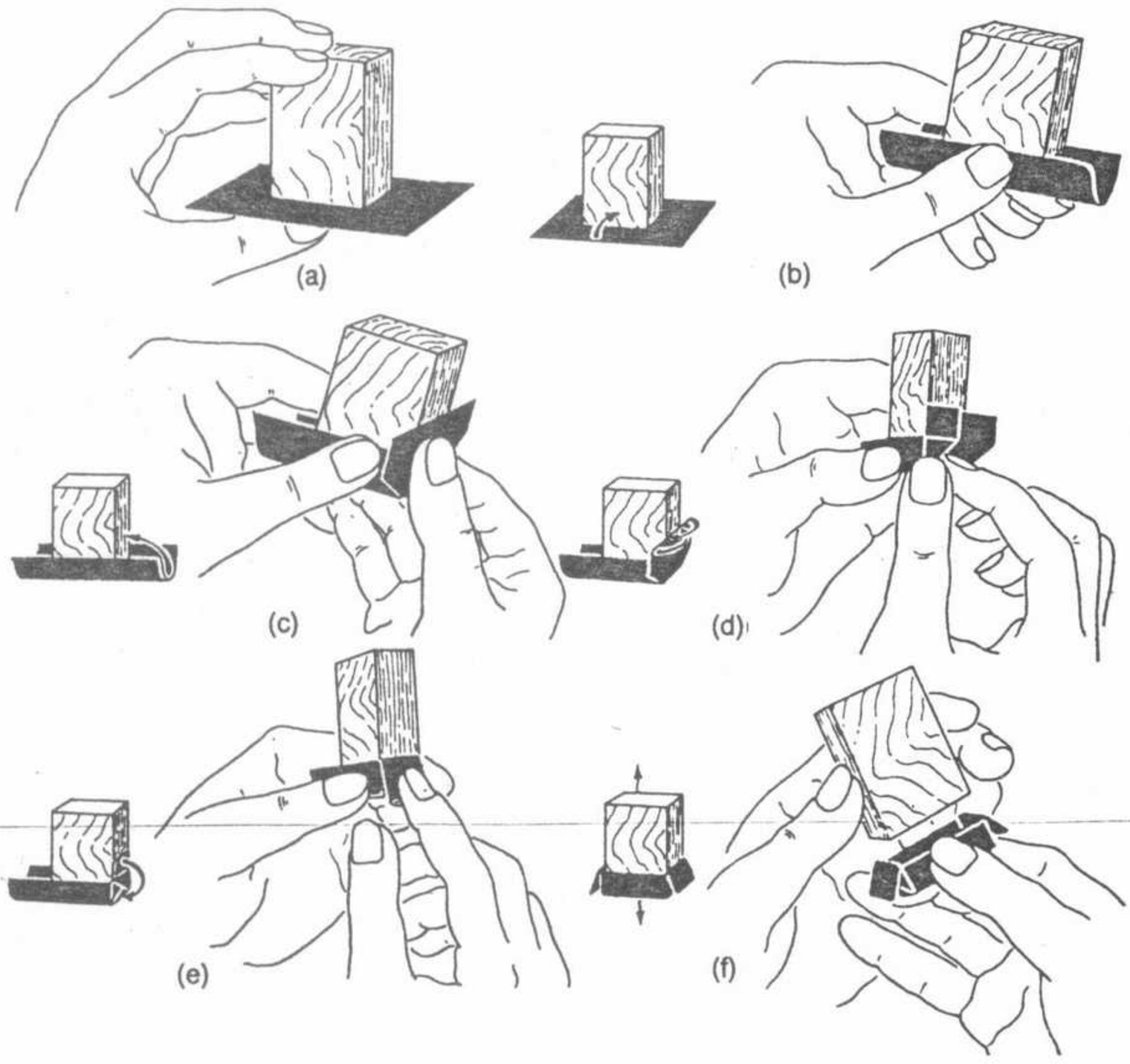


FIG. 133. — *Confección de un molde con papel de aluminio para hacer bloques de inclusión en parafina, según Gray.* g, los pliegues resultantes.

tálicos de tamaños distintos, de extracción fácil del bloque, moldes sin fondo que permiten ver por transparencia la pieza a incluir.

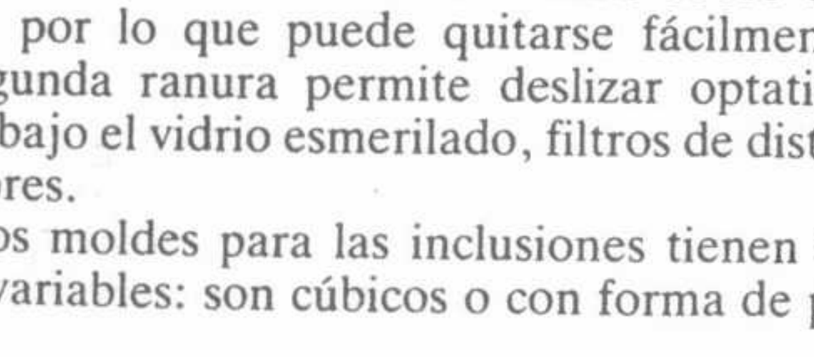


FIG. 134. — *Molde de inclusión, de dimensiones variables, denominado Barras o Pinzas de Leuckart.* Documento Prolabo, París.

Descripción del casillero de inclusiones. — El aparato (fig. 135) consta de dos partes independientes: una caja luminosa y un conjunto de moldes en los que se vierte la parafina líquida.

a) La caja luminosa de 20×9×8 cm de lado está equipada con una lámpara de 25 vatios, uno de los lados tiene la toma de corriente y un interruptor.

El fondo de esta caja está formado por una placa de vidrio esmerilado deslizante sobre una ranura, por lo que puede quitarse fácilmente; una segunda ranura permite deslizar optativamente, bajo el vidrio esmerilado, filtros de distintos colores.

b) Los moldes para las inclusiones tienen tamaños variables: son cúbicos o con forma de paralelepípedos rectangulares, de latón, abiertos por los dos extremos. Para impedir su oxidación son sumergidos una vez en un baño de ácido dicrómico. Esta protección es definitiva.

Los moldes dan las siguientes series, las medidas de su sección son las exteriores y el grosor del latón del orden de 1 mm por término medio.

4 moldes de 22×22 mm	10 moldes de 18×18 mm
8 moldes de 20×30 mm	6 moldes de 15×25 mm
20 moldes de 14×14 mm	

es decir, 48 moldes en total

Un botón cuyo tamaño corresponde a la sección interna de los moldes facilita algunas extracciones del molde.

La principal ventaja que ofrece este sistema consiste en la adopción de moldes sin fondo que favorece considerablemente sacar las inclusiones. Se obtienen con este método, de forma muy cómoda, bloques de caras paralelas que se recortan fácilmente antes de colocarlos sobre los portabloques del micrótomo.

Por otra parte este procedimiento permite, retirando cierto número de moldes, deslizar la parafina en el espacio que queda libre y así poder confeccionar bloques de mayores dimensiones cuyas caras están delimitadas por los restantes moldes.

Los efectos obtenidos con luz transmitida, con o sin filtros, aportan una considerable mejora al facilitar la orientación de las muestras en la para-

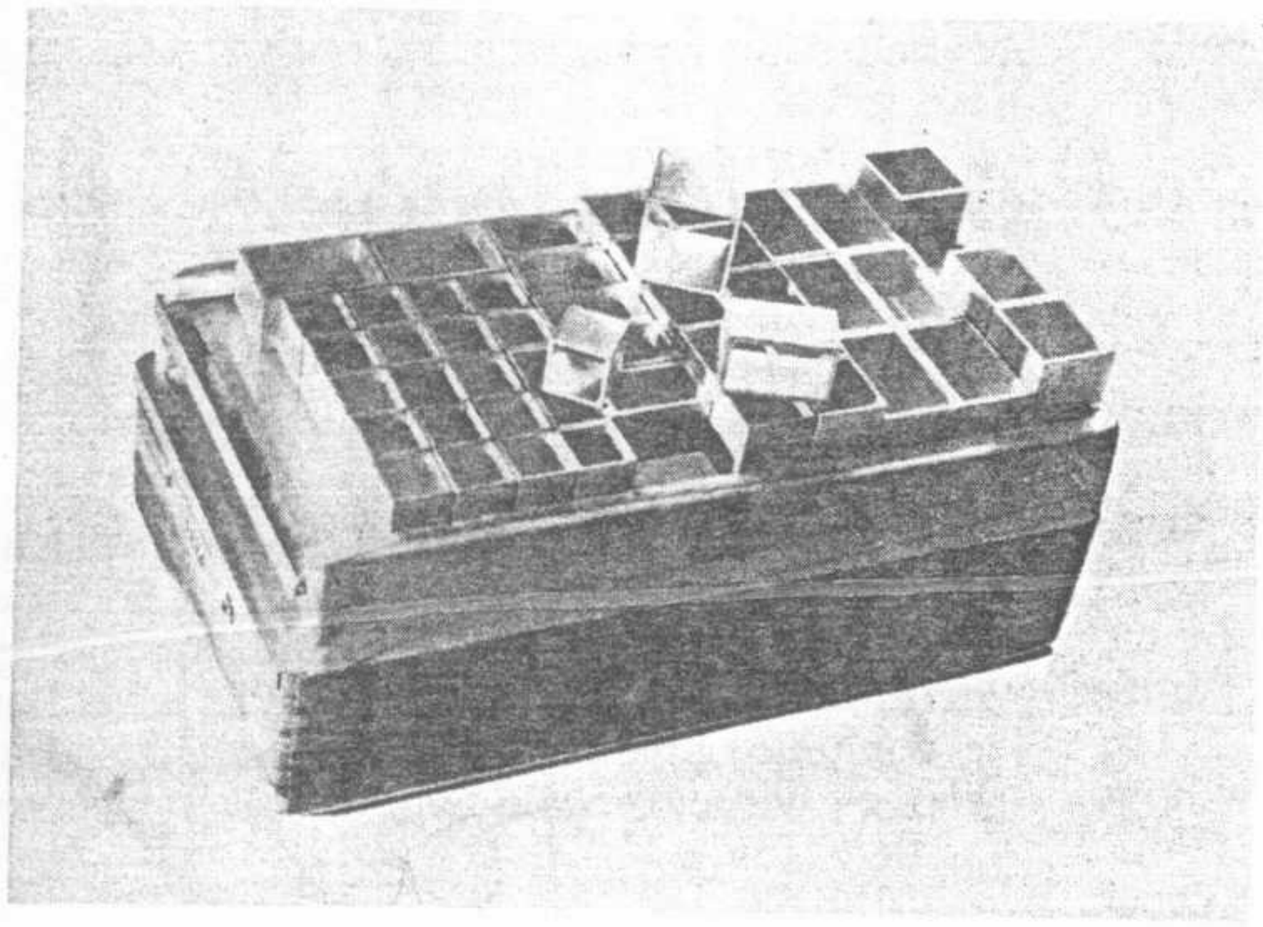


FIG. 135. — *Archivo de moldes amovibles de inclusión, situado sobre una caja luminosa.* Documento J. Rebière, Laboratorio de Zoología del Museo Nacional de Historia Natural, París.

fina, sobre todo de las piezas diminutas o poco pigmentadas. Aparte, el calor desprendido por la lámpara lentifica la solidificación de la parafina y deja más tiempo para depositar adecuadamente la pieza a incluir.

Si no es necesaria la observación por transparencia puede retirarse el soporte de vidrio y sus moldes de la caja luminosa, obteniendo un dispositivo de menores dimensiones.

En el cuadro de las descripciones mencionadas anteriormente, hay que subrayar que se han hecho diferentes ensayos de medios de inclusión: parafina, paraplast, esterwax; todos ellos han dado resultados satisfactorios.

Para obtener buenos resultados conviene, sin embargo, respetar una serie de precauciones elementales. Antes de hacer la inclusión, debemos recordar que hay que vigilar que los moldes que van a usarse estén libres de restos de parafina procedentes de inclusiones anteriores y estén suficientemente fríos, favoreciendo de esta manera la adhesión del medio de inclusión. Debe respetarse un mínimo tiempo de endurecimiento. El pulsador no sirve de nada en los casos en que se haya colocado un exceso de parafina y que se hubiera desbordado de los moldes así como en el caso de que no se hubiera enfriado suficientemente. Señalemos que colocar algunas gotas de glicerina sobre las paredes del molde antes de verter la parafina, evita cualquier adherencia.

Las inclusiones hechas sobre un soporte metálico se adhieren muy poco. Por el contrario, si se hacen sobre vidrio se adhieren generalmente bien pero de forma débil, lo cual es favorable cuando hay que sacar la inclusión del molde, ya que al sacar el molde, el bloque permanece fijado sobre su base y se desprende fácilmente por una simple presión del dedo.

Hay que advertir que un enfriamiento demasiado rápido induce la formación de tensiones entre el objeto y el bloque, que se manifiesta al extraer el bloque; mientras que un enfriamiento demasiado lento da lugar a grandes cristales que actúan desorganizando los tejidos.

Es siempe aconsejable dejar «reposar» (envejecer) el bloque antes de cortarlo. Los materiales bien incluidos se conservan sin alterarse durante varios decenios.

Consultar el capítulo: Microtomía, para conocer las operaciones siguientes.

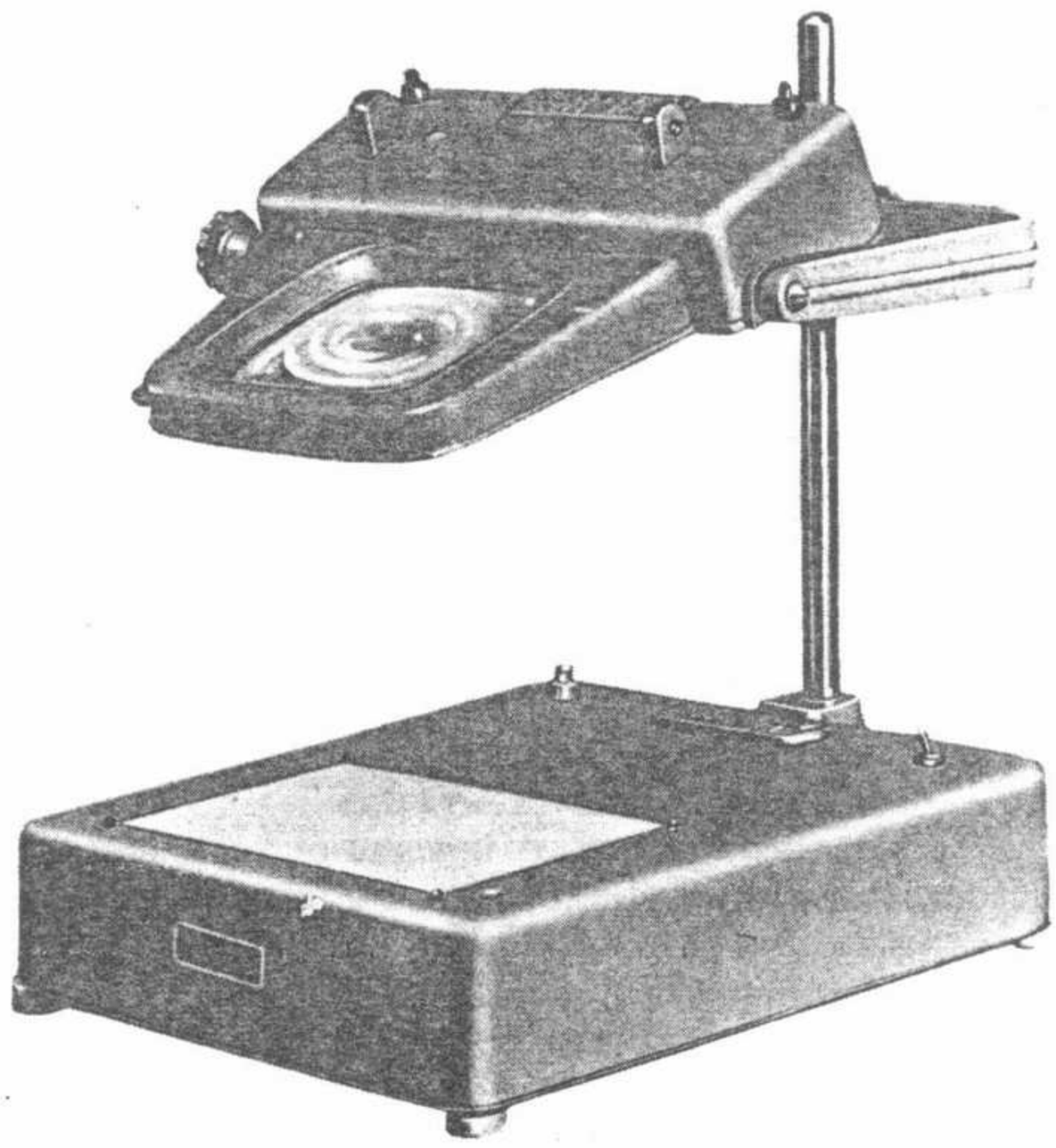


FIG. 136. — *Lupa simple Goliath F2 con iluminación incidente y tablero luminoso.* Este tipo de lupa es muy interesante para la preparación y elección de las muestras, así como para su orientación en los bloques. Documento Gruber, París.

Mezclas a base de parafina. — Mezclando dos parafinas de puntos de fusión distintos se obtiene una mezcla que funde a una temperatura intermedia. Estas mezclas tienen una ventaja sobre las parafinas puras: permiten, a igual temperatura de fusión, cortes de mejor calidad.

Se procede de la misma manera para las mezclas de parafina con cera de abeja o con ácido esteárico (componente de las bujías).

Únicamente la práctica permite escoger la mezcla óptima. En general, han sidó poco utilizadas para que podamos ofrecer una guía de recomendaciones y de empleo.

Mezcla esterwax de Steedman. — En peso: 73 % de diesterato de etilen glicol + 4 % de etil celulosa + 5 % de ácido esteárico + 8 % de aceite de ricino + 10 % de monoesterato de etilen glicol. Se encuentra preparado en el comercio.

La deshidratación previa se hace con monoetil éter de etilen-glicol (cellosolve) después de haber pasado por el etanol de 96°. Incluir largamente a la estufa a 60°. Verter en el molde y enfriar rápidamente. Recortar el bloque adecuadamente y cortar como si se tratase de parafina.

INCLUSIÓN EN CELOIDINA O COLODIÓN (NITROCELULOSA)

La celoidina, el colodión, el parlodión, la fotoxilina, así como otras numerosas marcas, nombran una única sustancia: la **nitrocelulosa.**

Es un explosivo sensible a los golpes, así como a una elevación de temperatura. Desde 1879, M. Duval la utiliza como medio de inclusión y su fama ha tenido sus momentos álgidos y sus bajas, como todas las modas. Pasadas estas vicisitudes hay un hecho que permanece inalterable: su valor histórico.

Es por ello que diversas generaciones han utilizado todas las variantes existentes que son más numerosas que las de la inclusión en parafina.

El método es mucho más lento: cuatro o cinco veces al empleado en la inclusión con parafina. Siendo, a la vez, más peligrosa por los riesgos que ofrece a la explosión o a la inflamación. No permite efectuar cortes seriados.

Sin embargo, posee innegables ventajas: penetra mucho mejor en los tejidos más heterogéneos y duros. Provoca menos retracciones, por lo que permite incluir piezas más grandes. Puede someterse el material a tinción y montaje sin haber eliminado previamente el medio de inclusión.[1]

Nuestra elección dependerá pues del tipo de material a estudiar: se escogerá, sin dudar, la celoidina cuando se trate de piezas voluminosas y sobre todo duras o heterogéneas, incluso descalcificadas.[2]

El medio de inclusión es una mezcla en partes variables de mono- y di- nitrocelulosa disuelta en diversos disolventes, siendo el éter-sulfúrico el más frecuentemente utilizado. Al comprar el producto será preferible escoger las nitrocelulosas tratadas con alcohol a las nitrocelulosas desecadas, dado que éstas son explosivas y muy sensibles a los golpes y a las elevaciones de temperatura.

A diferencia de la parafina, a la que una simple bajada de temperatura la endurece, para la celoidina se recurre a otro fenómeno fisicoquímico: se gelifica al ponerla en contacto con el alcohol de 70° o con el cloroformo. Vestigios de agua en las piezas o incluso la humedad atmosférica —cuidado con el aliento del operador— conduce a la formación de artefactos.

El producto en bruto: copos de celoidina embebidos en alcohol se disuelven en una mezcla a partes iguales de etanol absoluto y éter. Los reactivos deben ser totalmente anhidros. Esta solución madre se prepara al 8 %.

Las deshidrataciones de las piezas por los métodos habituales o por glicerina o por piridina deben ser perfectas. Sólo procediendo de esta manera se obtendrán óptimos resultados.

Inclusión de etanol-celoidina. — Es aconsejable añadir algunos cristales de fenol al último baño de la deshidratación. A continuación, se transfieren directamente las piezas a un baño totalmente anhidro de etanol absoluto + éter. Las piezas de pequeño tamaño se dejarán durante unas horas, las de gran tamaño permanecerán en dicho líquido de 2 a 4 días. Sigue un baño en celoidina del 4 %, después del 8 %, dejándolo un tiempo igual en cada paso. Este último baño se hace en un desecador y concentrando la celoidina a la mitad por evaporación del disolvente. El espesamiento de la mezcla debe ser lento, sin que aparezca una capa sólida en la superficie del líquido, que debe recubrir en todo momento la muestra. Si aparecieran burbujas se añadirá rápidamente un exceso de disolvente y se destruirán las burbujas perforándolas con un alfiler. Cuando la evaporación ha reducido a la mitad del volumen inicial señalado previamente con un rotulador en el recipiente, se procederá a la gelificación, colocándolo en un gran cristalizador cubierto y lleno de cloroformo o de alcohol de 70°. Al cabo de algunas horas se forma una película endurecida. En este momento se aumenta el volumen de cloroformo hasta llenar totalmente el recipiente que contiene la celoidina, la gelificación termina al cabo de 1 o 2 días.

1. Para ciertos autores esto representa una desventaja. *(N. de la T.)*

2. Es particularmente interesante para incluir centros nerviosos, ojos de tamaño considerable (por ej., de buey). *(N. de la T.)*

Se separa el bloque y se conserva en etanol de 70°, nunca debe conservarse en seco, dado el riesgo de explosión al exponerse a cualquier golpe.[1]

Inclusión en metanol-celoidina. — Con relación al método anterior, este tipo de inclusión permite una mejor penetración y mayor rapidez en el proceso. Sin embargo, los bloques son menos duros por lo que es más difícil obtener cortes delgados.

La deshidratación de los objetos se efectuará con metanol anhidro. Se sustituirá la mezcla etanol + éter por una mezcla de etanol + metanol o mejor incluso por metanol anhidro. La imbibición se hará en soluciones de celoidina al 2, al 4 y posteriormente al 8 % en metanol. Atendiendo al tamaño de la pieza, ésta permanecerá de 2 a 8 días en cada baño. La gelificación se hará directamente en la solución del 8 %, sin haberla concentrado previamente, proyectando un chorro de vapor de agua caliente durante 20 a 30 segundos y seguidamente introduciéndolo en la mezcla: cloroformo 3 partes + etanol de 70°: 10 partes. Dejar reposar durante 2 a 6 días. Conservar el bloque en etanol de 70°. No debe cortarse hasta haber pasado unos días.

Inclusión con glicerina-celoidina. — Se deshidratará el material en glicerina corriente y posteriormente con glicerina anhidra (31° Bé) como mínimo durante 12 h. Tras haber secado la muestra se coloca en un baño de celoidina al 8 % en alcohol-éter, colgando la pieza por un hilo hasta la mitad del recipiente. La imbibición expulsa la glicerina que cae al fondo del recipiente, de ahí la necesidad de un exceso de reactivo y el hecho de colgar la muestra. Al cabo de 2 a 4 días debe gelificarse procediendo como en el método del etanol-celoidina.

Inclusión en la piridina-celoidina. — Se fijará con formol. Se pasará directamente la muestra a una mezcla a partes iguales de piridina anhidra y de celoidina al 4 % en etanol. Se renueva la solución una vez al día. Todo el procesado dura dos días. Se pasa el material a celoidina al 8 % en etanol + éter y seguidamente se procede como en el caso del método de inclusión en etanol-celoidina.

INCLUSIÓN CON RESINAS EPOXI, CON METACRILATO Y CON POLIÉSTERES

Para obtener cortes ultrafinos, de grosor inferior a la décima de micra, se recurre a inclusiones en resinas duras que serán cortadas con micrótonos especiales portadores de cuchillas de vidrio o de diamante.

Hasta el presente los mejores resultados se han obtenido con los metacrilatos y las resinas epoxi.

Inclusión con metacrilato. — El monómetro comercial tiene un antioxígeno estabilizador que impide su polimerización. Es por ello que inicialmente debe eliminarse este compuesto, denominándose este proceso desestabilización. Se consigue lavando el monómero con una solución de sosa al 20 % y cambiándolo varias veces; posteriormente se lava bien con agua destilada hasta conseguir neutralizarlo. Luego, se deseca con silicagel. Seguidamente se procede a la preinclusión del material, después de tratarlo con acetona absoluta anhidra se somete a una mezcla de acetona y de monómero, a partes iguales y finalmente se coloca en dos baños de monómero puro. La permanencia en cada baño es de 1/2 h a 1 h. Se mejora considerablemente la penetración del compuesto haciendo la preinclusión bajo vacío, a baja temperatura. Se colocan las muestras así embebidas en pequeñas cápsulas de gelatina que se llenan de monómero y posteriormente se procede a la polimerización, ello se consigue añadiendo al monómero un 1 % de peróxido de benzoilo o, mejor aún, sometiéndolo a la acción de rayos ultravioleta. En el primer caso se coloca a la estufa a 45°, en el segundo caso se puede trabajar a temperatura ambiente o a la nevera, a 4 °C. El tiempo de polimerización es de unas 12 horas.

Inclusión con araldita (Resina epoxi). — Preparar antes de usar la siguiente mezcla:

Araldita:	10 ml
Endurecedor:	10 ml
Acelerador:	0,5 ml
Dibutilphtalato:	1 ml

Actuar como en el caso del metacrilato: para la deshidratación, la preinclusión debe hacerse a unos 50 °C, bajo vacío provocado por una tromba de agua. Cuando el material a estudiar es compacto y se incluye mal es conveniente pasarlo previamente por araldita pura sin acelerador ni endurecedor. La polimerización se lleva a cabo en 2 o 3 días a 50°.

Inclusión en vestopal (poliéster + estireno). — La deshidratación debe efectuarse forzosamente con acetona. Se embebe el material pasándolo por baños de concentración creciente de vestopal en acetona, añadiéndole un 1 % de perbenzoato de terbutil y un 0,5 % de naftenato de cobalto. Se colocan las cápsulas durante 24 h a 60 °C para que polimerice.

Inclusión con resinas epoxi hidrosolubles. — Algunas resinas de este grupo admiten objetos no deshidratados. La preinclusión se hace pasando

1. Aparte del riesgo hay el hecho de que en contacto con el aire el bloque se agrieta rápidamente y deberá desecharse. *(N. de la T.)*

el material por baños en agua cada vez más concentrados en resina; termina el proceso por un baño en una mezcla de: resina: 5 ml + endurecedor: 10 ml + acelerador: 1 ml + phtalato de butilo: 2 ml. La polimerización se hace durante 4 a 8 días a 60 °C.

INCLUSIÓN EN MEDIO HIDRÓFILO

Son inclusiones en geles, frecuentemente se utiliza la gelatina o la gelosa. Son extraordinarias para incluir tejidos particularmente frágiles o de elevado contenido en agua. Hay dos tipos de métodos, atendiendo a si se deshidrata o no la muestra. La gelosa y la gelatina, preferentemente en polvo, son equiparables, hasta el extremo que puede sustituirse perfectamente la una por la otra en las mismas proporciones y se obtienen resultados comparables. En caso de tener que escoger una quizá nos inclinaríamos por la gelosa.

Inclusión en gelatina o en gelosa según Apathy, especial para muestras pequeñas. — Disolver en caliente 50 g de gelatina o de gelosa en 175 ml de agua + 25 g de glicerina. Conservar a la estufa a 60° en un recipiente abierto colocado en un desecador hasta que se evapore totalmente el agua; el líquido muy viscoso puede entonces «estirarse en hilos». Dejar enfriar, recortar fragmentos y conservarlos en recipientes cerrados.

En el momento de usarla hay que apilar, sin mezclar, en un tubo, capas sucesivas de: agua glicerinada al 50 %; agua destilada; etanol de 30°, de 70° y de 90°. Colocar el material fijado, lavado y saliendo del etanol de 96° en esta última capa. Aguardar hasta que caiga al fondo del tubo (son varios días). Pasar por dos o tres baños de agua glicerinada. Traspasar el material a una mezcla, en partes iguales de agua glicerinada + gelatina glicerinada obtenida tras disolver, en caliente, una parte del material de inclusión colocado en reserva en 7 partes de agua. Dejar a la estufa a 40° durante 1 a 2 días. Poner el objeto en su masa de inclusión previamente filtrada y colocada en el molde. Se deja el conjunto en un desecador a 60°, hasta que el volumen quede reducido a la mitad. Dejar enfriar, sacar el bloque del molde, cortarlo con un escalpelo ligeramente untado con aceite de parafina, de manera que tenga unas dimensiones que no sobrepasen los 5 mm. Con una aguja entomológica, sujetar el bloque sobre un tapón, girarlo y sumergirlo en etanol absoluto renovándolo diariamente durante 5 días. Embeber el bloque de terpineol, mediante 2 a 3 baños durante cinco días. Conservarlo en seco. Cortar como si se tratara de celoidina.

Inclusión en gelatina o gelosa formolada. — Se han propuesto diversas variantes; para mayor detalles, remitimos a Gabe (1968).

El modo de proceder recomendado es el siguiente:

Fijar de 12 a 24 h con una solución acuosa de formol al 4 %. Lavar de 2 a 5 h con agua corriente (es decir, que circule). Colocar el material así lavado en el medio de inclusión formado por: gelatina en polvo del 10 al 15 % con o sin glicerina: 15 % + un cristal de timol en agua. Preinclusión en la estufa a 37° de 12 a 24 h. Este tiempo puede reducirse a 1-2 h en el caso de muestras muy pequeñas. Vèrterlo en un molde y seguidamente enfriarlo. Endurecer con formol, durante 1 h si se trata de la solución comercial (40 %), o durante 24 h si se hace con una solución diluida, del orden del 10 %. Conservar en formol diluido al 4 %. Cortar por congelación (cf. pp. 162 y 163).

Inclusión con los polietilen glicoles (Carbowax). Fijar y lavar cuidadosamente el material. Colocar el objeto en el medio de inclusión a la estufa, a 60°. Embeber bien el material durante 4 h a 4 días, atendiendo sus dimensiones. Traspasar la pieza a un molde lleno de la misma sustancia, orientarlo adecuadamente y dejar enfriar. Cortar como si se tratara de parafina.

Para incluir tejidos vegetales y especialmente hongos no fijados previamente, recomendamos cualquiera de los dos métodos siguientes.

Inclusión con goma de cerezo plúmbica. — Una solución acuosa de goma tratada con acetato de plomo y sometida a la acción de vapores de amoníaco se gelifica y puede ser cortada con el micrótomo:

Utilizar una solución acuosa de goma en agua al 30 % en peso a la que se le añadirá después de haberla filtrado un 30 % de subacetato de plomo acético (por haberle adicionado un 5 % de ácido acético cristalizado). Se obtiene un jarabe viscoso en el que se colocan las piezas para incluir, previo lavado en el caso de haber sido fijadas. Llenar el molde con el jarabe, colocar la pieza y exponerlo a vapores saturados de amoníaco en un recipiente cerrado hasta que se endurezca y tenga una consistencia conveniente: de 5 a 10 minutos. Tras haber tallado el bloque, dándole las dimensiones deseadas, se pega sobre el portamuestras mediante goma y se deja endurecer de la misma forma. Cortar con una navaja oblicua como en el caso de la celoidina, humedeciendo la cara del bloque que se corta con una solución acuosa al 1 % de ClNa; después de haberlo adherido sobre el portaobjetos mediante albúmina de Mayer, insolubilizándola con vapores de formol y disolver la goma con ácido acético acuoso al 5 %. Teñir, deshidratar y montar.

Inclusión con jabón de glicerina. — Preparar una solución de jabón transparente de glicerina al 25 % con etanol de 70° + 1-2 % de gelosa o de

gelatina; evaporar al baño maría hasta la formación de una película. Pasar las piezas por etanol de 90° algunos minutos, lavar durante 6 h con agua, colocarla en un vidrio de reloj y dejar embeber el material a la estufa durante 2 h, sacar las piezas y cortarlas a mano alzada o con un micrótomo de mano.

Los metacrilatos hidrosolubles. — Se emplean para la obtención de cortes ultrafinos que tras digestión enzimática deban ser estudiados al microscopio electrónico. Se usan dos resinas: el glicol-metacrilato y el hidroxi-propil-metacrilato, puros o mezclados con metacrilato corriente (butil + metil). El manejo de estas sustancias es delicado (en muchos casos provocan alergias); para mayor detalle remítase a los trabajos de Leduc y colaboradores.

INCLUSIONES MIXTAS: GEL-PARAFINA

Hay dos tipos de métodos atendiendo al hecho de que el material de inclusión sea homogéneo o heterogéneo.

Inclusión homogénea: celoidina-parafina. — Fijar, lavar, deshidratar en tres baños de etanol de 96° (a excepción de que la muestra proceda de un fijador alcohólico, tipo Carnoy, por ejemplo). La permanencia en cada baño es de unas 2 h; eventualmente en el último paso puede dejarse durante 12 h; embeber el material pasándolo por dos baños de 12 h cada uno de ellos, de celoidina al 1 % disuelta en salicilato o en benzoato de metilo. Puede mantenerse en este último paso durante más tiempo; secar con papel de filtro, pasar seguidamente el material por dos baños de benceno durante unos 30 minutos; después se pasa por dos baños de parafina de 1-2 h, pudiéndose hacer bajo un vacío moderado. Llenar el molde, recortar el bloque y proceder a cortar como si se tratara de parafina.

Doble inclusión: celoidina-parafina. — Someter el material a los pasos descritos para la inclusión en celoidina pura en la solución del 4 %; dejarlo varios días. Secar las piezas con papel de filtro; sumergirlos en cloroformo hasta que caigan al fondo; aclarar con benceno fenicado al 10 % en peso; seguidamente incluir con parafina. Llenar el molde, tallarlo y cortar como si se tratase de parafina. Permite obtener cortes muy delgados según Pfuhl.

Doble inclusión: gelosa-parafina. — Facilita enormemente la inclusión de objetos excesivamente pequeños para ser manipulados y orientados fácilmente (Chatton, 1923).

Preparar una masa de gelosa al 1,3 % en solución acuosa formolada al 2,5 %. Conservar en frío.

Extender sobre un portaobjetos una espesa capa de esta solución, depositar sobre ella los materiales a estudiar y orientarlos bajo lupa; seguidamente se deposita una segunda capa para proceder a incluirlos. Enfriar, tallar pequeños bloques que en una segunda etapa serán reincluidos con parafina procediendo de la siguiente forma: deshidratar por el sistema automático etanol-esencia de girasol (cf. p. 137); pasar por un baño de parafina disuelta en esencia de girasol, obteniendo una concentración del 50 %, después pasar directamente a parafina pura, a una temperatura ligeramente superior al punto de fusión. Hacer el molde, recortarlo adecuadamente y proceder a cortar como si se tratara de parafina. Para facilitar la manipulación de los bloques de gelosa pueden teñirse con eosina o bien con safranina. Para facilitar la visualización de los cortes pueden colocarse dos nervios osmificados diametralmente opuestos y orientados perpendicularmente al plano de la sección.

VII. — OBTENCIÓN DE LOS CORTES

LOS MICRÓTOMOS

Son instrumentos que con la ayuda de una navaja permiten obtener cortes delgados de los materiales a estudiar. Los más sencillos son *manuales,* estando formados por un cuerpo cilíndrico hueco en el que se coloca y sujeta el material a cortar previamente englobado con médula de saúco, con zanahoria o bien con hígado fijado. Un «pistón» blando situado en la base eleva regularmente el material a cortar al accionar un tornillo micrométrico. La cuchilla o navaja histológica, sostenida por la mano, se hace incidir sobre el material, con un típico movimiento de deslizamiento. Estos instrumentos no permiten obtener cortes excesivamente delgados a la vez que no es posible conseguir cortes «seriados». Los materiales frágiles o con elevado contenido en agua son difíciles de cortar por este sistema.

Una versión más elaborada conduce a la *con-*

gelación que a la vez de solidificar y dar consistencia al material a estudiar lo mantiene en posición frente a la cuchilla que tiende a deformarla. La congelación se obtiene bien por un chorro de CO_2 frío o bien por efecto Pelletier, o bien por el frío de un recipiente en el que se coloca el micrótomo, denominado en este caso «criostato». El «micrótomo de congelación» es indispensable cada vez que se quiera cortar un material sin provocar alteración enzimática interna. Permite trabajar directamente y con gran rapidez sobre las biopsias recién hechas.

La congelación posibilita cortar materiales muy acuosos y blandos. Las muestras no deben ser demasiado pequeñas. Cuando el material es heterogéneo hay el peligro de provocar desplazamientos locales.

El modelo de micrótomo más generalizado es el *micrótomo de parafina* tipo *Minot;* se trata de una maravilla mecánica en cuanto a su simplicidad, sin juego, con avance automático y permite la obtención de cortes seriados de bloques de parafina. Cada corte se adhiere al anterior por lo que permite llevar a cabo un estudio seriado del material (muy interesantes para estudios de embriones), con lo que es posible reconstruir su disposición. Los cortes más delgados que se obtienen con este micrótomo son del orden de los 5 μm, más delgados son difícilmente obtenibles (figuras 137 y 144).

El mismo instrumento pero en versión horizontal permite obtener cortes de materiales incluidos en la celoidina (o colodión) cuando el material requiere este tipo de inclusión.

Algunos micrótomos derivados de este modelo tienen una mecánica particularmente amplia y robusta para poder obtener cortes de materiales tan voluminosos como pueda ser el de un cráneo humano entero.

Aparte de la mecánica, la parte esencial del micrótomo es su navaja o cuchilla. El mantenimiento de la cuchilla requiere una serie de precauciones, facilitadas en gran parte por aparatos que afilan automáticamente las cuchillas.

La **microtomización** o método de utilización del micrótomo será desarrollado en las páginas 161 y siguientes, consagradas especialmente a la obtención de cortes tras la inclusión.

Para escoger un micrótomo se tendrán en cuenta los parámetros siguientes: dimensiones medias y extremas del bloque a cortar, tipo de bloques, necesidad o no de proceder sin previa inclusión, necesidad de obtener cortes seriados, mínimo grosor de los cortes.

Los **micrótomos especiales** que se requieren para los estudios con el microscopio electrónico poseen un sistema de avance del material a cortar muy distinto, ya que se requieren cortes de grosor muy por debajo de la micra, utilizando objetos cortantes distintos a la clásica cuchilla: siendo de vidrio o de diamante, dado que el medio de inclusión habitualmente utilizado es el plástico y su dureza requiere este tipo de cuchillas.

Los utensilios cortantes

Los micrótomos están equipados de utensilios cortantes que son: navajas, cuchillas de vidrio o de diamante.

Forma de la navaja. — Varía según el tipo de material a cortar. Para obtener cortes por el sistema de la mano alzada puede ser suficiente una simple navaja de barbero, aunque es preferible utilizar una navaja que esté vaciada por una cara, de manera que la cara que se apoya sobre el material a cortar sea plana (fig. 138,2). Es recomendable coger una cuchilla un poco pesada y voluminosa para poderla dominar al cogerla. El mismo tipo de navaja puede utilizarse al emplear el micrótomo de mano (o de Ranvier) y el micrótomo de Rocking; sin embargo, para los grandes micrótomos se requieren cuchillas especiales. Así los micrótomos de deslizamiento del tipo Jung van siempre acompañados de sus correspondientes navajas, siempre de grandes dimensiones. La elección es más difícil cuando se trata de micrótomos tipo Minot, ya que hay muchos tipos de cuchillas. Nuestra opinión personal es que la mejor forma es la que está representada en la figura 183,3. Se trata de una cuchilla muy consistente que tiene las dos caras planas y en sus extremos está dotada de unas empuñaduras que facilitan considerablemente su afilado y suavizado. Con una cuchilla de estas características se pueden

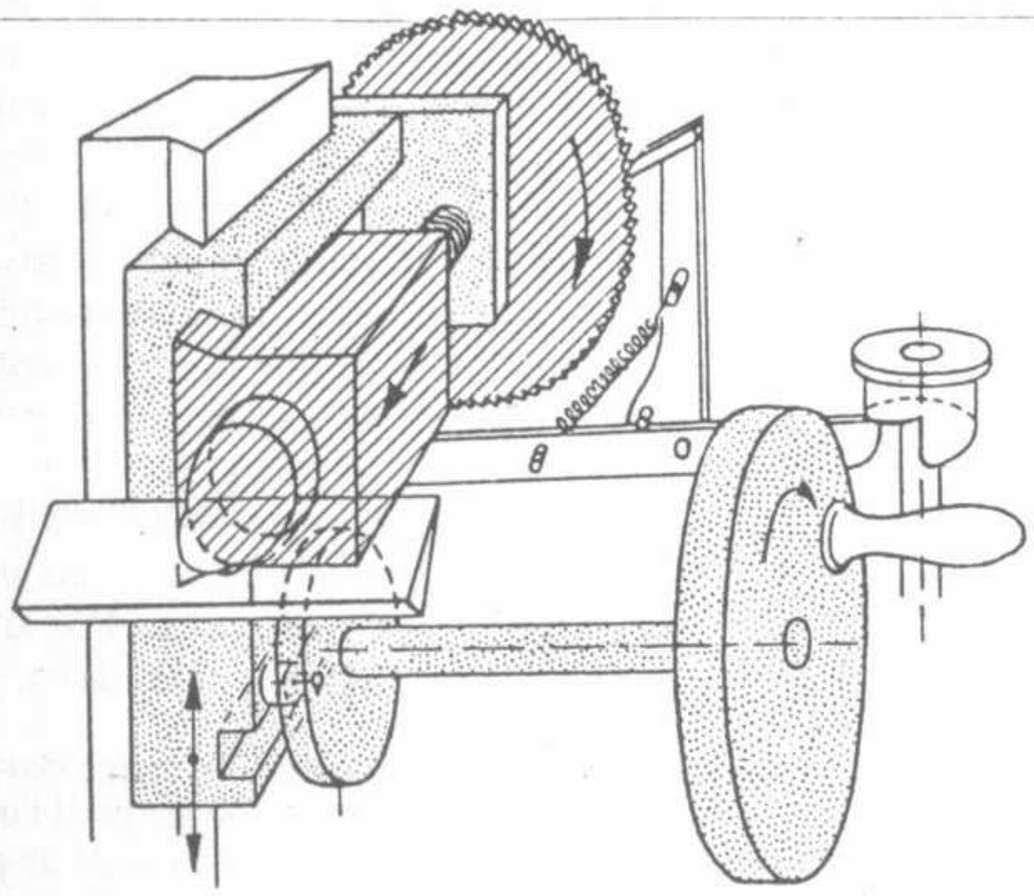


FIG. 137. — *Principio del micrótomo de Minot según Policard, Bessis y Locquin.* Las piezas lentamente móviles en rayado, el mando rotativo alternativo en punteado.

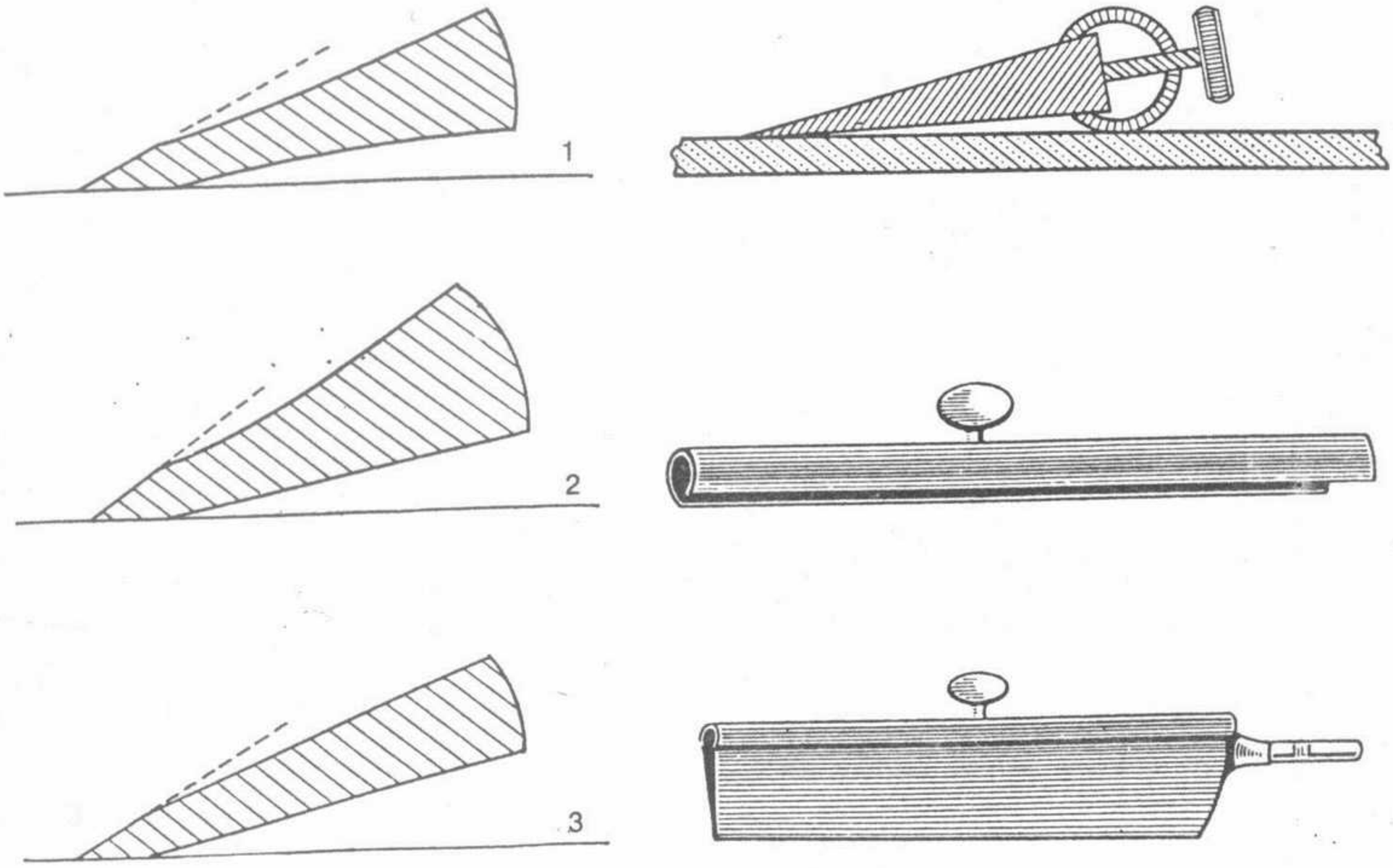


FIG. 138. — *Cuchillas o navajas para micrótomos.* A la izquierda, los tres perfiles principales; a la derecha, el dorso que se usa para permitir obtener los biseles.

cortar todo tipo de materiales incluidos en parafina o en colodión. P. Masson prefiere dar al filo la forma asimétrica representada en la figura 138,2; la cara más inclinada debe estar frente al bloque a cortar. Gracias a esta particularidad se evita en gran parte el aplastamiento de la parafina, con lo que los cortes obtenidos son de mejor calidad. Este resultado se obtiene mediante un aparato de afilar especial, que consiste simplemente en pasar la lámina sobre las caras 3 y 4 de la correa de cuero.

El grosor de la cuchilla, así como su ángulo de corte pueden escogerse siguiendo determinados criterios. Las cuchillas de filo muy delgado son adecuadas para cortar materiales blandos y delicados mientras que las de filo más grueso, en forma de triángulo isósceles, son para cortar materiales duros y resistentes. Las cuchillas del primer tipo son muy adecuadas para la obtención de cortes a mano alzada o con el micrótomo de mano, mientras que las cuchillas gruesas, de cara muy ancha, del segundo tipo, son las más adecuadas para obtener cortes en parafina y de forma general para todo tipo de trabajos rutinarios.

La forma del filo también puede variar. O bien las dos caras de la cuchilla se aproximan, formando un ángulo más o menos agudo, como es el caso de las cuchillas corrientes, o bien forma un bisel cuyas caras se disponen como se aprecia en el esquema de la figura 138,3. Esta última disposición es más cómoda para el suavizado y repasado de la cuchilla; evidentemente, para el mantenimiento de la regularidad de la primera forma habrá que usar toda la superficie de la cuchilla mientras que en el segundo caso únicamente hay que repasar las dos caras del bisel, lo cual simplifica enormemente las operaciones.

CUCHILLAS DE NAVAJAS MECÁNICAS. — Su uso es cada vez más frecuente para todos los modelos de micrótomos, inclusive el de tipo Minot y se encuentran fácilmente en el comercio. En los catálogos de los fabricantes figuran asimismo portacuchillas especiales que varían atendiendo al tipo de micrótomo a que van destinadas. Para las navajas de los micrótomos de mano los pequeños mangos portacuchillas, que son muy fáciles de encontrar, pueden servir perfectamente. El afilado se lleva a cabo con pequeños aparatos especiales, fáciles de conseguir. La utilización de estas cuchillas es sumamente cómoda y fácil, sobre todo para los no iniciados, para los estudiantes y para los naturalistas que viajan.

Afilado de la navaja. — Estudiando la manera de actuar de la navaja veremos que puede considerarse como una cuña al penetrar en los tejidos para cortarlos. Cuanto más delgado y más pulido sea el filo menos se alterará el tejido y los cortes serán más finos. Sea cual fuere la forma y el grosor de la navaja, su filo, biselado o no, debe tener un pulido perfecto. Cuantas menos estrías microscópicas tenga el filo éste penetrará más fácilmente a través de los tejidos y causará menos desperfectos. Efectivamente, las pequeñas estrías que deja un afilado incorrecto sobre el acero impiden que el filo penetre bien, los dientes y las mellas desgarran las células y producen, en los cortes seriados, rayas que pueden fragmentar todo el corte y deben ser desechados.

Si el filo es excesivamente delgado al hacer los

cortes éste se debilita o se dobla, si bien esto no es frecuente en el caso de las cuchillas que sirven para cortar la parafina, aunque el ángulo que presenta va disminuyendo a medida que se corta, haciéndose menos agudo, aparecen mellas microscópicas y disminuye el afilado. El afilado tiene por finalidad devolver al filo su forma y su pulido primitivo. Ante todo, debe quitarse una delgada capa de acero a fin de poder rectificar sus caras y después pulirlas lo mejor posible.

Con demasiada frecuencia el afilado es una operación empírica, llevada a cabo por algunos profesionales. Sin embargo, los primitivos procedimientos de suavizado sobre el cuerpo son ya historia y no son más que una forma de salir al paso. Un afilado correcto debería ser controlado y hacerse con los sistemas de pulido empleados en óptica y en metalografía microscópica; de esta manera se llegarían a obtener superficies bastante perfectas para que a unos 750 aumentos no se apreciara ninguna estría.

Así, Cambridge Instrument Co. aconseja eliminar los dientes mediante una piedra de esmeril de muy buena calidad, totalmente plana. A continuación, se pasa sucesivamente por dos láminas de vidrio, la primera está embadurnada por abrasivo Sira; cuando el filo es examinado a 200 aumentos parece regular, seguidamente se pasa a la segunda lámina de vidrio embadurnada con rojo óptico de grano muy fino. Finalmente, se completa el afilado pasándola rápidamente por un cuero duro, evitando redondear el filo de la cuchilla.

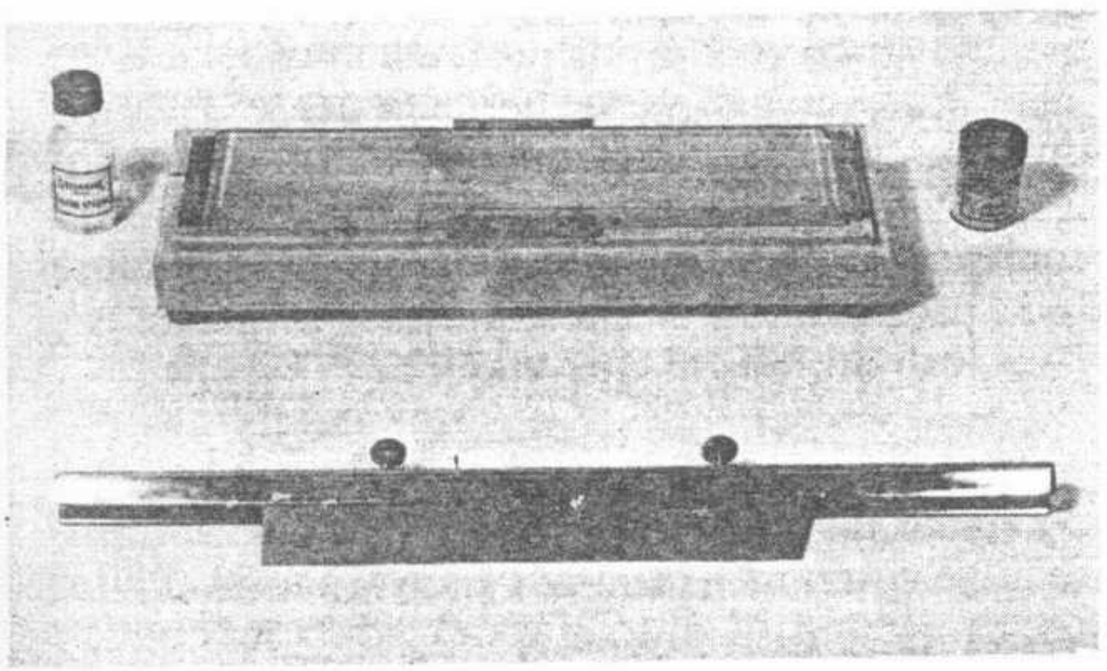


FIG. 139. — *Placa de vidrio suavizado para el afilado de las cuchillas.* Abajo, cuchilla sin su dorso de afilado. Documento Stiassnie, S. N. M., París.

Métodos de afilado. — Habitualmente el afilado consiste en emplear sucesivamente la piedra y el cuero. La piedra sirve para eliminar las mellas y rectificar un filo demasiado redondeado; el cuero sirve para perfeccionar el afilado obtenido sobre la piedra y agudizar el filo cuando éste está embotado pero no mellado (fig. 140).

APARATOS DE AFILADO. — Sea cual fuere el sistema de afilado, piedra o cuero, la condición primordial es de conservar la forma y la inclinación del filo de la navaja. Para lo cual el filo debe tener una inclinación conveniente con respecto a la superficie de pulimento. No hay que tomar ninguna precaución especial en el caso de las navajas de caras anchas, recomendadas para la obtención de cortes en parafina, basta con apoyar la cuchilla bien plana sobre la piedra o el cuero. En el caso de las navajas corrientes, de cara estrecha, hay que tener el dorso de la navaja un poco elevado, a fin de no dar al filo un ángulo excesivamente agudo. Dado que es difícil tener a mano esta inclinación se utilizan aparatos de afilado. Hay dos tipos de máquinas de afilar, unas para las cuchillas destinadas a cortar parafina y en congelación, en que el filo forma un ángulo bastante abierto y debe incrementarse el grosor del dorso, en este caso se utiliza una especie de cilindro hueco (fig. 138) portador de una ranura en la que se coloca el dorso de la cuchilla. El diámetro de este cilindro da a la cuchilla la inclinación deseada, basta con aplicar sobre la piedra el filo y el cilindro (fig. 139). Para las cuchillas que tienen una cara plana y la otra cóncava se pule la cara plana con un aparato formado por un triángulo metálico.

P. Masson emplea un aparato de afilar particularmente aplanado sobre un lado, permitiendo dar al bisel de la cuchilla la forma disimétrica representada por la figura 138,2. Este aparato es suficientemente largo para poder ser sujetado por la mano a cada extremo.

Piedras de afilar. — El estudio detallado de las piedras de afilar se ve dificultado por el hecho de que las denominaciones vulgares no corresponden adecuadamente a la nomenclatura petrográfica y mineralógica. A continuación haremos algunas consideraciones. En principio, una buena piedra de afilar debe tener el grano muy fino (de 1 a 3 μ), bien cementado, muy uniformemente distribuido y tan duro como el acero. Los granos demasiado gruesos o los que se desprenden producen irregularidades en el filo: mellas. Asimismo, la *piedra litográfica* no es conveniente dado que su grano es calcáreo, demasiado blando y se desprende del cemento, por lo que se estropea fácilmente y afila de forma desigual. La *piedra de Levante*, o piedra con aceite, tampoco es buena debido a que su grano es demasiado duro. La piedra de mejor calidad es la de *Arkansas*, especie de filado de color amarillento-ámbar, de grano muy delgado (aproximadamente 1 μ) y bien cementado. Puede sustituirse la piedra por una placa de vidrio esmerilado muy plana, recubierta de una pasta formada por aceite de oliva y esmeril del más fino (figura 139).

Líquido a utilizar. — Nunca hay que suavizar una cuchilla sobre una piedra seca, ya que las partículas de acero no tardarían en ocupar los espacios que separan los granos y éstos actúan de forma incorrecta e irregular. El líquido sirve pues para mantener en suspensión las partículas de acero desprendidas en el afilado y los restos de la propia piedra.

Los líquidos más frecuentemente utilizados son el agua, el agua jabonosa, el aceite de petróleo, el aceite de vaselina y el aceite de oliva. Cuanto más espeso sea el líquido, mejor se adhiere a la piedra, haciéndola más suave al colocarse entre los granos y disminuyendo de esta manera su grosor. Una misma piedra puede, pues,

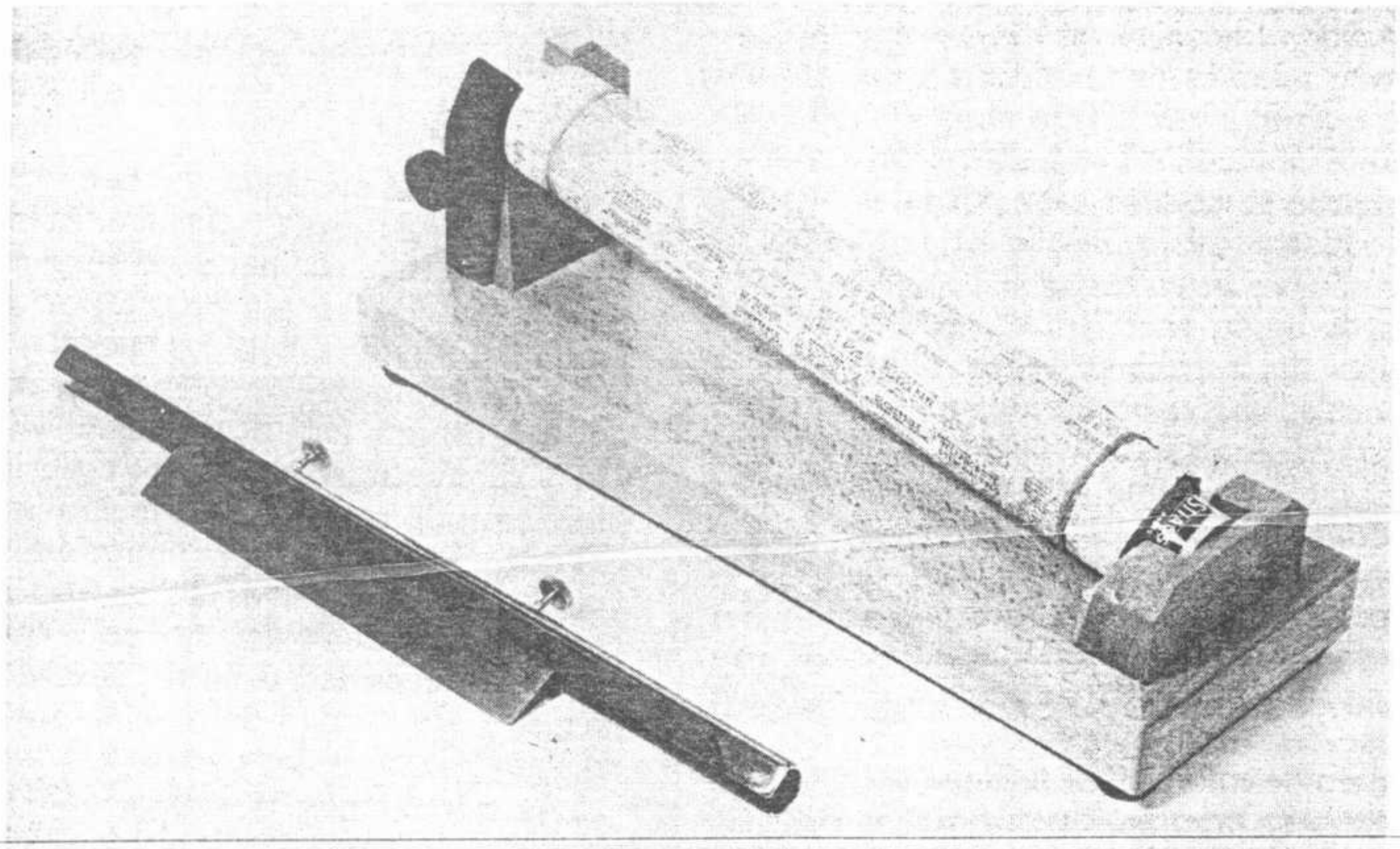


FIG. 140. — *Cilindro de pulido rodeado por un papel de periódico para ultimar el afilado; la cuchilla está siempre provista por su dorso de afilado abajo.* Documento Stiassnie, S. N. M. París.

actuar de dos formas, según se recubra de agua o de aceite.

Las piedras lubrificadas con agua deben secarse bien después de su uso y preservarlas del polvo y de las manchas de grasa. En caso de haber áreas grasientas pueden limpiarse con jabón. Las piedras que trabajan con aceite deben conservarse ligeramente embebidas de este líquido: se preservan del polvo y deben secarse antes de usarlas de nuevo.

Afilado sobre la piedra. — *Sobre la piedra el filo de la navaja debe hallarse siempre dirigido hacia adelante.* Para ello se coge la navaja por su mango o por sus dos extremos, según su forma. Inicialmente se apoya el dorso sobre la piedra, después el filo, a fin de asegurarse que ninguna falsa maniobra nos lo deteriore. Se acerca oblicuamente la cuchilla hacia uno, el filo hacia adelante, de forma que se utilice toda la longitud de la piedra al pasar una de las caras de la cuchilla. Llegado al extremo de la piedra, se gira la cuchilla y se vuelve a aplicar siguiendo las mismas precauciones y se desliza, siempre con el filo hacia adelante. Cuando se trata de cuchillas con mango siempre se procede de la base a la extremidad; cuando son cuchillas de extremos simétricos se empieza siempre por uno de los extremos, siempre debe ser el mismo.

Debe apretarse muy ligeramente la cuchilla sobre la piedra, incluso en el caso de las cuchillas de gran tamaño, su propio peso es suficiente para asegurar el afilado. Es muy importante pasar sobre la piedra el mismo número de veces para cada una de las caras de la cuchilla.

FILVÁN. — Antes de que aparezca el filván debe cesar la acción de la piedra. Se denomina filván a una delgadísima placa de acero que se forma a ambos lados del filo. A causa de su elasticidad es imposible eliminarlo sobre la piedra; si se insiste en la operación sólo se consigue aumentar su grosor. Sin embargo, cuando hay que eliminar mellas profundas se prescinde del filván.

Suavizado o pulido sobre el cuero. — Dado que el filo obtenido tras el paso por la piedra siempre tiene algo de filván, así como estrías y dentículos microscópicos, es imprescindible pasar la cuchilla por la correa de cuero para que desaparezcan estos defectos. Puede sustituirse el cuero por el papel de periódico (fig. 140).

Sobre la correa, el dorso de la cuchilla debe estar siempre dirigido hacia adelante. Salvo este hecho, las precauciones a tomar son las mismas que en el caso de la piedra; se utilizan aparatos de afilado y se usa toda la longitud del cuero para cada una de las caras de la cuchilla. Debe apoyarse muy poco y pasarla rápidamente. Las cuchillas pesadas serán giradas haciéndolas bascular sobre el dorso, con la finalidad de no estropear ni el filo ni la correa.

La acción del cuero se debe a su elasticidad, se deprime bajo el peso de la cuchilla, gracias a lo cual se quiebra el filván y desaparece. Por otro lado, el filo queda unido, pulido y duradero.

Existen muchos modelos de correas de cuero para el afilado de las cuchillas. Uno de los mejores es el cuero cuadrado de cuatro caras. Una de las caras sirve de piedra, otras dos están embadurnadas de pasta negra de grano mediano y de pasta roja de grano muy fino. La cuarta cara es de cuero limpio y es la que se utiliza para el pulido definitivo. Algunas correas de dos caras tie-

nen una de ellas de médula de saúco, sumamente eficaz para eliminar el filván, la otra sirve para el pulimento. Finalmente, las largas correas de cuero son cómodas para el suavizado de las grandes cuchillas.

Independientemente del modelo de correa usado, *el pulido definitivo debe hacerse sobre un cuero no embadurnado;* efectivamente, las pastas actúan de la misma manera que las piedras y sirven para eliminar los dientes y las asperezas del filo. Al pasar de la piedra al cuero y de una cara a la otra del mismo, debe secarse cuidadosamente la cuchilla.

No debe pasarse nunca por el cuero una cuchilla mellada, ya que desgarraría irremediablemente esta cara de la correa.

COMPROBACIÓN DEL FILO. — Tras el afilado sobre la piedra, debe comprobarse el filo, para lo cual existen distintos procedimientos. Según Sobolew, el mejor sistema consiste en poner el dorso de la cuchilla sobre cuatro dedos de la mano izquierda y pasar seguidamente, de forma ligera, la pulpa del pulgar sobre el filo. También se puede colocar plana sobre la palma de la mano y, sin apoyarla, comprobar si corta las papilas epidérmicas. Otro sistema bueno consiste en intentar cortar un pelo al tener la cuchilla sobre la parte dorsal de la mano.

Cómo actúa la cuchilla. — La cuchilla actúa de dos maneras distintas, atendiendo a si cortamos materiales húmedos o secos, es decir, elásticos o no. Para hacer cortes a mano alzada o de materiales elásticos (bloques de colodión), la cuchilla debe deslizarse oblicuamente, mientras que en los micrótomos de parafina actúa perpendicularmente sobre la superficie del bloque. En ambos casos, la cuchilla actúa como una cuña: la posición oblicua únicamente está motivada para alargar y adelgazar la sección de esta cuña. La mayoría de autores están actualmente de acuerdo en admitir que la cuchilla actúa siempre como si fuera una cuña y nunca como si fuera una sierra, sea cual fuere su oblicuidad. Efectivamente, cada zona del material no es nunca atacada por un solo punto de la cuchilla. Al colocar la cuchilla oblicuamente se consigue aumentar la distancia de la base al filo, con lo que el ángulo de corte será más agudo. Cuando el material a cortar es elástico, susceptible a curvarse bajo la presión de la cuchilla, ésta debe actuar oblicuamente, a fin de penetrar más fácilmente sobre el objeto y sin doblarlo. Por el contrario, cuando se trata de materiales duros pueden atacarse normalmente sobre una de sus caras.

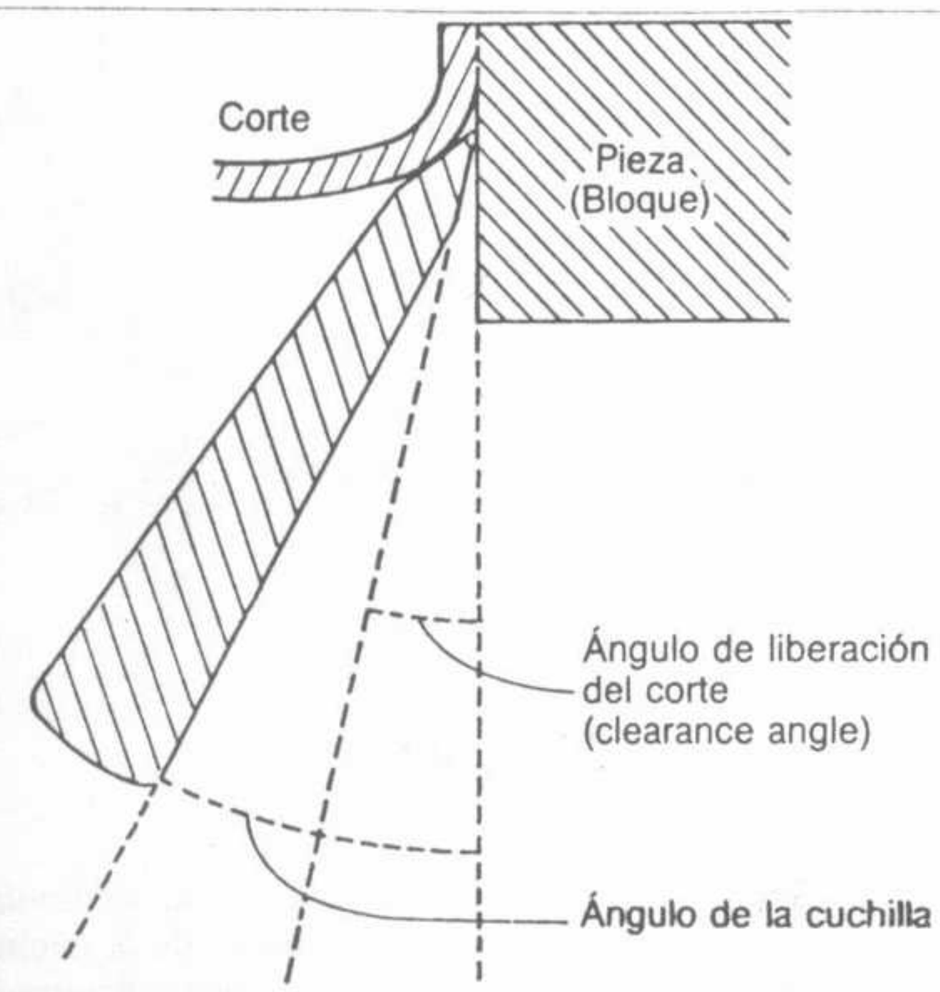


FIG. 141. — *Esquema de cómo ataca la cuchilla al bloque; los ángulos han sido exagerados.*

APARATOS AUTOMATIZADOS PARA AFILAR LAS CUCHILLAS

Cuando un laboratorio tiene que asegurar un mínimo de cortes es recomendable invertir en la adquisición de un aparato para afilar cuchillas. En general, constan de una placa giratoria de vidrio destensado y humedecido con agua, un sistema de desplazamiento de la cuchilla durante su paso por la plataforma y un mecanismo de elevación y giro para aplicar la otra cara. Aparte de la ganancia de tiempo que representa disponer de uno de estos instrumentos, que funcionan solos a la perfección, una vez hecha la puesta a punto del instrumento, con este aparato, se tiene asegurada una gran regularidad de ángulo de corte y de afilado.

Habrá que remitirse a las instrucciones de los fabricantes para ver cómo funcionan estos instrumentos automáticos.

Cuchillas de vidrio. — Los ultramicrótomos que deben obtener cortes ultrafinos a partir de bloques de plástico de materiales destinados a ser estudiados con el microscopio electrónico, están dotados de cuchillas de vidrio. Después de cortar una pieza de vidrio en forma de cuadrados se vuelve a cortar por la diagonal por un fraccionamiento progresivo. La fractura brillante y concoidal tiene un filo agudo que servirá de cortante. Esta parte se puede ir desplazando a medida que se va cortando y al finalizar el trabajo se tira la cuchilla.

Cuchillas de diamante. — Son pulimentadas con sumo cuidado por los fabricantes y tienen una duración considerable, que depende de las horas de trabajo y del tipo de material que se corta. Se pueden volver a pulir. Sin embargo, se trate de un lujo del que se puede prescindir, dado que son muy costosas, a no ser que se hayan de cortar materiales particularmente duros, como metales.

MICROTOMIZACIÓN

Cortes a mano alzada

Este método apenas se usa, salvo para la histología vegetal, dado que los tejidos animales son habitualmente demasiado blandos para ser cortados de esta forma, mientras que la pared que posee la célula vegetal da consistencia a los tejidos vegetales. Se requiere como instrumentos: una buena cuchilla que tenga una cara plana y cilindros de médula de saúco, a los que previamente se les ha eliminado la corteza que posee elementos muy duros, o bien puede utilizarse zanahoria o incluso hígado fijado.

Atendiendo a su consistencia, el objeto se corta directamente, en fresco o bien tras una previa fijación (alcohol para los tejidos vegetales). Para ello se toma un fragmento relativamente grande del material. Se coge un fragmento cilíndrico de médula de saúco, de zanahoria o de hígado fijado, y se corta de forma longitudinal, completamente o sólo practicando una hendidura, entre las dos partes, como si se tratara de un bocadillo; se coloca el material que se desea cortar. Para practicar el corte de la médula de saúco se utiliza un escalpelo bien afilado o, incluso, mejor una cuchilla. En el caso de que el material a cortar sea cúbico o cilíndrico se hace una pequeña cavidad en las dos mitades del cilindro de médula de saúco o bien se perfora con un objeto puntiagudo, como una aguja.

Se puede cortar comprimiendo simplemente el conjunto entre los dedos, pero es más cómodo asegurar esta compresión bien sea mediante un hilo o con una pinza de madera de tender ropa, una pinza de Bunsen con los extremos forrados de caucho, etc.

Una vez englobada la pieza en la médula de saúco se coge el conjunto entre el pulgar y el índice de la mano izquierda y se coge la cuchilla con la mano derecha. Se puede cortar de delante hacia atrás (con el filo orientado hacia el corte), de atrás hacia adelante (filo en sentido inverso): el primer movimiento parece más natural, pero el segundo permite observar mejor el filo y el material a cortar y también apoyar la cuchilla sobre la uña del pulgar. Sea cual fuere el sistema adoptado la cuchilla debe siempre atacar el objeto oblicuamente y debe usarse la mayor parte posible de la longitud de la cuchilla en cada corte. Es por ello que la cuchilla debe avanzar cada vez de izquierda a derecha, de la base al extremo de la cuchilla, sin sacudidas y con un movimiento uniforme. Se procura obtener cortes cuanto más delgados mejor, e intentando cortar toda la superficie. A fin de facilitar el ataque del cilindro de médula se puede tallar previamente en bisel.

Si el material tiene una determinada consistencia, puede cortarse en seco, pero si se trata de tejidos delicados o si hay el riesgo de que el material se seque demasiado rápidamente debe sumergirse de vez en cuando el cilindro de médula en alcohol de 70° o bien mojarlo pasando encima de ellos un pincel a la vez que tras haber obtenido cada corte hay que lubrificar también la cuchilla con este líquido que se tiene en un pocillo.

En ambos casos hay que recoger los cortes en un pequeño cristalizador que tiene alcohol o bien agua. Los cortes se recogen con ayuda de una aguja o de unas pinzas, o mejor con un pincel de la superficie de la cuchilla y se pasan al cristalizador, procurando no desgarrarlos. Colocando el cristalizador sobre un cartón o una placa de vidrio medio negra y blanca, será fácil eliminar los fragmentos de médula de saúco o de zanahoria y escoger los cortes más delgados para teñirlos y montarlos.

La médula de saúco no siempre es conveniente para la englobación, puede utilizarse en sustitución el hígado previamente fijado con formol, el corcho o la zanahoria. El hígado empleado puede ser del tipo amiloide o simplemente hígado de buey o de ternera endurecido con alcohol, se cortan fragmentos más o menos gruesos, entre los que se coloca el material a cortar habiendo practicado con anterioridad una hendidura en caso de que sea necesario. El corcho es conveniente cuando el material a cortar es muy duro y se corta en seco, debe escogerse un tapón de corcho fino, con una navaja o bisturí se corta por la mitad y se engloba como en el caso de la médula de saúco.

El método de obtención de cortes a mano alzada da excelentes resultados en manos diestras, pero requiere una gran habilidad y seguridad. Su principal ventaja es su simplicidad. Años atrás había sido muy utilizada, algunos célebres botánicos habían obtenido por este sistema cortes seriados de un saco embrionario, tan buenos como los que se obtienen con los micrótomos automáticos.

Cortes con el micrótomo de mano

Los micrótomos de mano dan los mismos resultados que los obtenidos con la técnica de la mano alzada, pero se consiguen con mayor facilidad cortes de grosor más constante. El micrótomo de Ranvier es el prototipo de estos aparatos. Este instrumento consta de un cilindro coronado por una ancha plataforma; se coloca el material previamente englobado en médula de saúco o zanahoria, en el hueco del cilindro. Un pistón accionado por un tornillo micrométrico hace subir el material unas pocas micras. La cuchilla corta todo lo que sobrepasa la plataforma. Con estos instrumentos la delgadez de los cortes depende exclusivamente del afilado de la cuchilla y de la

perfección del micrométrico elevador, aparte de la habilidad del operador. El primitivo modelo de Ranvier en el que debía sujetarse el material con la englobación en médula de saúco y hacerla hinchar colocando el conjunto en un recipiente con alcohol débil, o bien efectuar una englobación con parafina, ha sido perfeccionado. En los modelos actuales (fig. 142) el cilindro de médula de saúco o zanahoria se sujeta mediante una pinza interna al micrótomo; esta pinza puede ser de ajuste lateral (fig. 142) o central, como en el micrótomo de Génat. El tornillo micrométrico hace elevar también la pieza que sujeta el material, entonces con una buena cuchilla pueden obtenerse cortes de 10 μ e incluso de 5 μ. Como los cortes son muy regulares pueden incluso llegar a tener 15 mm de diámetro.

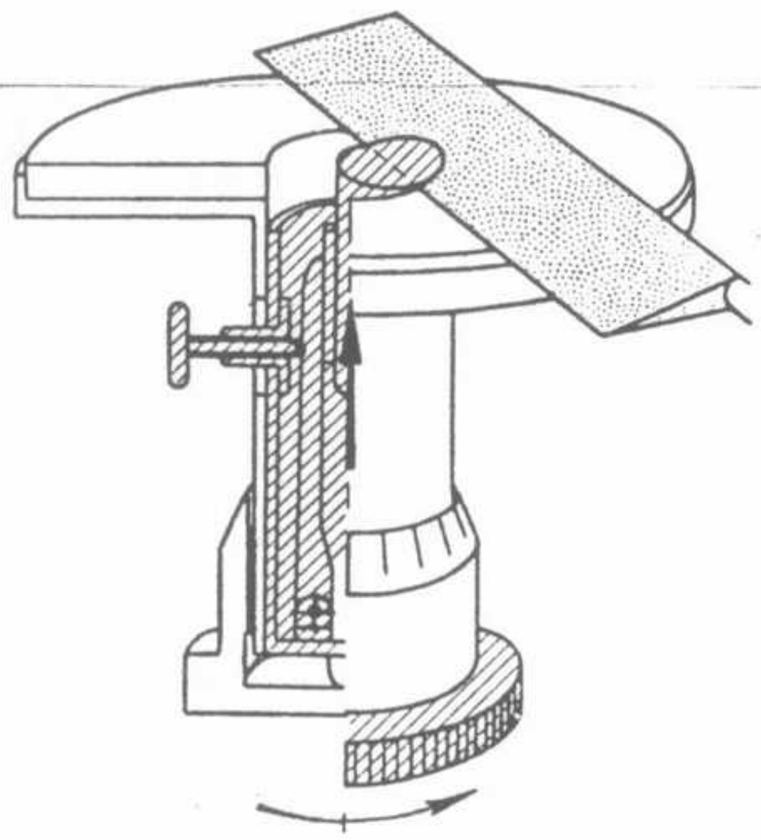


FIG. 142. *Micrótomo de mano, con tornillo de avance graduado y cilindro interno de englobación de médula de saúco.* No debe olvidarse que hay que lubrificar (mojar) el material y la cuchilla con un alcohol rebajado con agua (por ej., alcohol de 70°) antes de cortar para evitar la adhesión y plegado de los cortes.

Para utilizar este instrumento es imprescindible que la cuchilla tenga una cara totalmente plana. Se sujeta el micrótomo con la mano izquierda, cogiendo la plataforma con el pulgar y el índice; la navaja, sostenida con la mano derecha, se apoya sobre la plataforma de manera que quede totalmente plana. Se desliza muy oblicuamente apoyándola al presionar suavemente la cuchilla con el pulgar situado sobre la hoja. A fin de obtener cortes uniformemente delgados y evitar sacudidas es importante que el antebrazo y la mano formen un conjunto rígido y el desplazamiento de la navaja debe hacerse únicamente moviendo el brazo.

Se corta en seco o mojando la cuchilla y el material, atendiendo al tipo de tejido. En ambos casos se recogen los cortes en un cristalizador lleno de agua o de alcohol. Previamente se pueden haber eliminado los restos de médula con una aguja o mejor con un pincel.

El micrótomo de Génat representa un auténtico adelanto en el diseño de los micrótomos de mano. La cuchilla está formada por una lámina delgada, del tipo de las que se usan para las cuchillas mecánicas (Gillette), está sólidamente fijada sobre la plataforma del micrótomo. Una guía, acoplada a esta plataforma, permite efectuar con el tubo que contiene el material a cortar el movimiento de vaivén necesario para la confección de cortes. La cuchilla, situada oblicuamente con relación a este movimiento, desprende una delgada película en cada desplazamiento del tubo por la guía. El tubo encierra el tornillo micrométrico que hace subir el objeto de unas micras determinadas y el aparato de sujeción se acciona con un tornillo.

A los micrótomos de mano hay que añadir un excelente instrumento, se trata del micrótomo del tipo Lelong. Este aparato, muy sencillo y muy sólido, está formado por un pesado bloque rectangular metálico que contiene un plano inclinado, sobre el que desliza el carro portaobjeto. Este carro, que tiene exactamente la forma del plano inclinado, está provisto de una pinza entre cuyos labios se coloca el material englobado en médula de saúco. El conjunto es desplazado, sobre el plano inclinado, mediante un tornillo micrométrico, cuya cabeza lleva un tambor con divisiones. La cuchilla se desliza por dos guías de vidrio que se hallan en los extremos del borde metálico. Se corta como en el caso del micrótomo de mano, apoyando ligeramente la cuchilla sobre las guías, por su cara plana. Gracias a su peso, este modelo de micrótomo tiene mucha estabilidad y no es necesario sujetarlo. A mi juicio, es mucho mejor que los micrótomos de mano alzada utilizados para cortar material englobado en médula de saúco o de zanahoria; también pueden cortarse con él bloques de colodión. Según el material a cortar debe sumergirse en agua o en un alcohol débil, así como también se ha de lubrificar la cuchilla y, tras haberlo cortado, debe secarse cuidadosamente el instrumento.

L. de Crozant ha diseñado un aparato muy sencillo y poco costoso que permite cortar con el micrótomo Lelong materiales incluidos en parafina sin que los cortes se enrollen. El dispositivo consiste en intercalar, entre la cuchilla y los planos de vidrio del micrótomo, una pieza que confiere a la cuchilla una inclinación suficiente para evitar el roce del filo sobre el bloque de parafina y, por consiguiente, el calentamiento de la cara inferior del corte que conduce al enrollamiento.

Cortes por congelación

Principio. — La congelación de la pieza se lleva a cabo a través de una platina con efecto Pelletier o mediante el suministro de gas licuado (anhídri-

do carbónico), siendo este último procedimiento el más utilizado. El material embebido de agua se coloca sobre una gota de agua sobre la cara superior de una platina. El agente refrigerador es conducido a la platina, allí se volatiliza enfriando lentamente la platina y el material. Cuando la pieza ha alcanzado suficiente consistencia se frena el suministro de líquido.

Los cortes obtenidos por congelación son de gran interés para el histólogo, ya que son ideales para aplicar técnicas histoquímicas (sobre todo para el estudio de las grasas) y al anatomopatólogo, para poder efectuar diagnósticos rápidos. Ello es debido a que pueden cortarse los materiales en fresco, es decir, sin previa fijación y sin someterlos a la acción de disolventes que se utilizan habitualmente como deshidratantes, ni de líquidos intermediarios. Por todo ello, la integridad bioquímica de las células queda totalmente resguardada.

A estas ventajas se oponen una serie de graves inconvenientes. Los cortes de tejidos congelados, incluso los procedentes de material fijado, son bastante irregulares por lo que deben desecharse muchos de ellos. Los seleccionados son extremadamente frágiles y muy delicados de manipular. Deben transportarse de uno en uno, con una espátula, pasándolos por los diversos reactivos colocados en vidrios de reloj. Cuanto más delgados sean los cortes más frágiles son, a la vez que resulta muy difícil obtener cortes menores a 10 e incluso de 20 μ en determinadas ocasiones, depende mucho de la consistencia del material. Los mejores resultados se obtienen con fragmentos pequeños y de textura homogénea.

Cuando se trata de efectuar un diagnóstico, P. Masson ha señalado que debía tenerse en cuenta una serie de posibles errores que pueden desprenderse del estudio de las piezas de biopsia cortadas en estas condiciones. Si la lesión es poco extensa, puede perderse entre los cortes que ha debido desecharse, es por lo que debe guardarse siempre una muestra del material para incluir en parafina.

Este último procedimiento da cortes mucho más informativos y actuando sobre secciones de 1 mm con un fijador muy penetrante, como pueda ser el de Duboscq-Brasil, se puede tener listo para cortar en dos o tres horas. La fijación, la deshidratación mediante alcohol de 95° y dos pasos por alcohol absoluto, dos baños por el agente intermediario, el tolueno o el xilol, dejándolo unos treinta minutos, es decir, en una hora y media el procesado ya se ha completado; pueden ser suficientes dos baños de quince minutos cada uno en parafina, lo que conduce a unas dos horas el procesado global. Contando el tiempo invertido en los cambios de la muestra por los diversos reactivos, la confección del bloque de parafina, etc., llegamos a las tres horas escasas y el resultado obtenido es incomparablemente superior y más seguro. Si se añade una hora para la obtención de cortes, tinción y observación, puede llegar a darse un diagnóstico cuatro horas después de haber efectuado la biopsia.

Se gana tiempo ya que se evitan los largos procesamientos que deben seguirse cuando se va a hacer una inclusión en parafina o en celoidina, se evita la acción de reactivos que destruyen las actividades enzimáticas de los tejidos, se pueden cortar materiales blandos o duros, o bien materiales heterogéneos, ya que la congelación amortigua las diferencias de consistencia que presentan los materiales. Se puede trabajar sobre materiales frescos, es decir, no sometidos al proceso de fijación previa, no incluidos, o sobre materiales fijados no incluidos o sobre piezas incluidas.

Antes de congelar el material éste debe ser hidratado en el caso de que no proceda del agua. Si la pieza está fijada debe ser cuidadosamente lavada antes de ser congelada. Las piezas incluidas en gelatina o en gelosa son tratadas como las anteriores. Las piezas se sujetan al portamuestras mediante una gota de agua colocada sobre el mismo, directamente, o sobre un fragmento de papel de filtro embebido en agua y colocado sobre dicho portamuestras, y el enfriamiento se obtiene de distinta manera, atendiendo a los modelos de micrótomos. Puede obtenerse por enfriamiento del conjunto criostático, o bien por efecto Pelletier o por chorros de CO_2. Es muy importante controlar convenientemente la dureza del material antes de cortarlo. Cuando el bloque es demasiado duro con relación a la orientación de la cuchilla los cortes quedan pulverizados; a una temperatura ligeramente menor saltan y a más baja todavía se doblan sobre la cuchilla. Se recogen con una espátula, aunque es mejor utilizar un pincel y se depositan en el agua donde se extiende. A fin de obtener cortes seriados, se van sacando uno por uno y se van depositando, individualmente, en vidrios de reloj adecuadamente numerados.

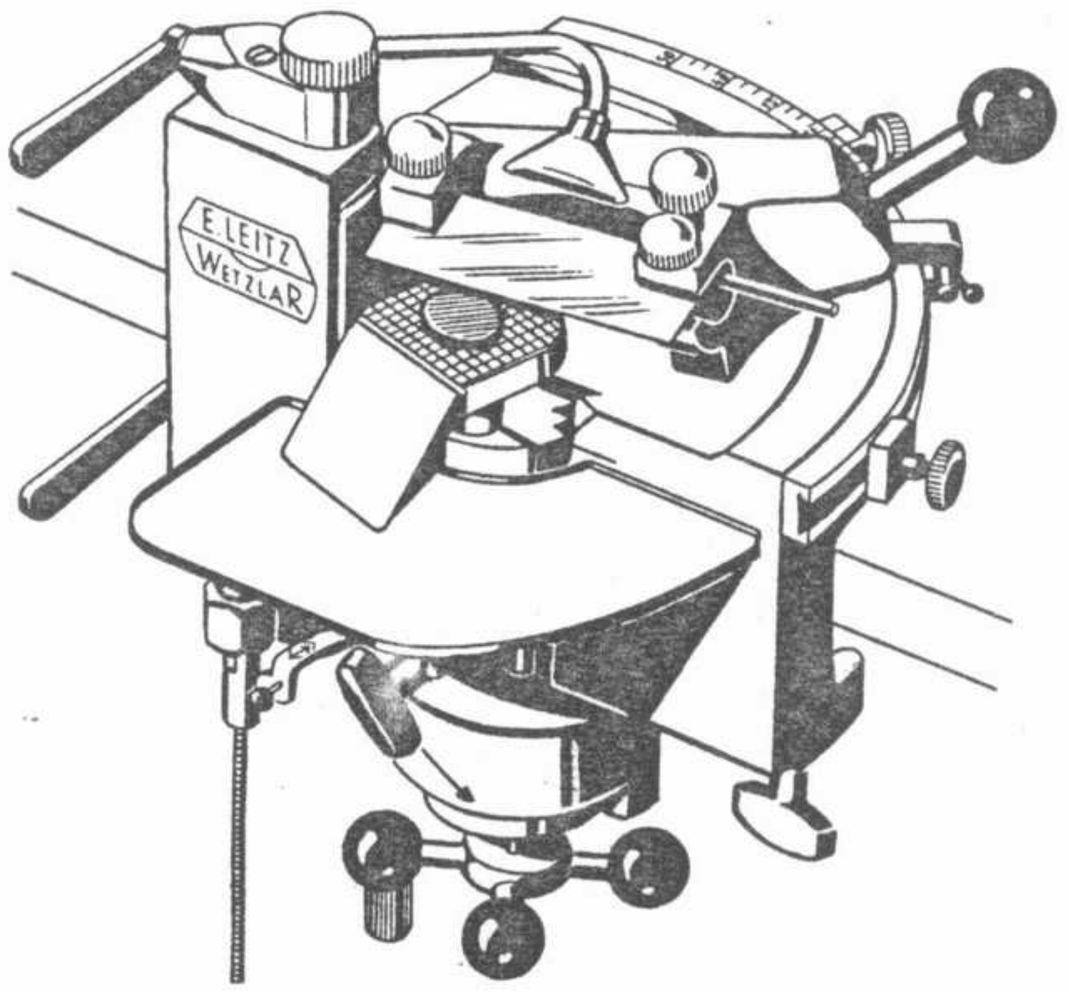


FIG. 143. — *Micrótomo de congelación con enfriamiento a base de CO_2 líquido.* El movimiento de la cuchilla es rotativo; el sistema conductor del fluido refrigerador enfría simultáneamente a la cuchilla y al bloque. Documento Leitz Wetzlar.

Micrótomos. — Es posible adaptar un portamuestras refrigerante por efecto Pelletier o por CO_2 a la mayoría de los modelos de micrótomos, inclusive en el de Minot, propio de la parafina. G. Poujol ha descrito algunos procedimientos muy sencillos para efectuar esta adaptación al micrótomo de Minot. Sin embargo, cuando se usa frecuentemente la congelación es preferible adquirir uno de ellos (fig. 143). El CO_2 parece preferible al efecto Pelletier, fundamentalmente por el hecho de que permite enfriar la cuchilla, siendo éste un detalle muy interesante a tener en cuenta.

Técnica de la congelación. — Parto del hecho de que se utiliza uno de estos micrótomos y que se dispone de una bombona de ácido carbónico licuado. La bombona debe estar en posición invertida mediante un trípode especial. Se une la platina del micrótomo a la boca de salida de la bombona mediante un tubo metálico y se ajusta cuidadosamente a los dos extremos.

La pieza a cortar debe tener un pequeño volumen y no tendrá más de 5 mm de grosor. Se deposita sobre la platina del micrótomo previamente recubierta por un papel de filtro embebido de agua y se mantiene ahí presionándola suavemente con el dedo o con el mango de un escalpelo.

Una vez efectuada esta operación previa se abre con precaución la espira de la bombona y se regula la salida del gas abriendo y cerrándola alternativamente, de forma que se consiga la adhesión del bloque sobre la platina y después se va congelando esta pieza progresiva y lentamente. Cuando el material tiene suficiente consistencia nos disponemos a obtener los cortes. Se empieza el bloque haciendo una sección de unas 20 μ y cuando la superficie es totalmente uniforme se hacen cortes de 10 a 15 μ.

Los cortes buenos se adhieren a la cuchilla plegándose. Con la pulpa del índice y con la máxima precaución se cogen y se trasladan a un cristalizador con agua destilada donde se desdoblan y se extienden.

Fallos y soluciones. — Si la pieza está demasiado congelada y demasiado dura, la cuchilla chirría y los cortes quedan pulverizados. Basta aguardar unos minutos para que la consistencia sea la adecuada.

Por el contrario, si la pieza no es excesivamente dura los cortes se aplastan, forman una papilla. Basta entonces con abrir la espita del anhídrido carbónico hasta que el material adquiera la consistencia necesaria.

En la mayoría de los casos, los cortes obtenidos por las tres técnicas anteriores son teñidos *in toto*, sin ser adheridos al portaobjetos. Finalizado

FRACASOS Y SOLUCIONES AL CORTAR EN CONGELACIÓN

El material a cortar no se congela	La platina se enfría pero no se cubre de hielo La platina se cubre de hielo	La bombona está vacía o tiene una fuga La bombona tiene una esfera y se ha colocado invertida Se ha utilizado un fijador alcohólico
Tras haber obtenido los primeros cortes se despega el bloque	La cara inferior del objeto es irregular Se interpone una película de hielo entre la pieza y la platina	Repiramidar el bloque a cortar Presionar el bloque Colocar una hoja de papel de filtro humedecida entre el portabloques y el bloque Si el objeto es de pequeñas dimensiones incluirlo previamente en gelatina o en gelosa.
Los cortes se pulverizan	La cuchilla está mal afilada. El material está demasiado frío.	Cambiar de cuchilla. Esperar un poco.
Los cortes quedan aplastados y forman un magma incoherente sobre la cuchilla	El objeto no está suficientemente congelado El objeto no ha sido bien fijado o ha sido fijado demasiado rápidamente	Congelarlo de nuevo Hacer los cortes más gruesos Enfriar la cuchilla y recoger los cortes individualmente

el proceso de la tinción se pescan con un portaobjetos bien desengrasado ligeramente embadurnado con gelatina o con albúmina desecada. Se aplica seguidamente un trozo de papel de filtro sobre cada corte colocado sobre su portaobjetos y se presiona ligeramente con la ayuda de otro portaobjetos. Levantando cuidadosamente el segundo portaobjetos se retira el papel de filtro previamente humectado con un poco de agua. La tinción y el montaje de los cortes deben hacerse seguidamente.

Cortes en celoidina

Con este método no pueden obtenerse cortes seriados. La orientación oblicua de la cuchilla con respecto al borde de ataque es esencial. Los micrótomos tipo deslizamiento son preferibles al modelo Minot, dado que son más versátiles.

El bloque conservado en etanol de 70° es adherido sobre el portabloques mediante una solución de celoidina al 8 % y presionándolo suavemente. Se sumerge el conjunto durante 2-3 horas en etanol de 70°. Se le da al bloque la forma de un paralelepípedo rectangular con un ángulo bien marcado por el lado opuesto al de ataque de la cuchilla, a fin de facilitar la orientación del bloque. A continuación, se traslada el conjunto en etanol de 90° y posteriormente se pasa por benceno fenicado al 10 % hasta que llegue al centro del bloque y adquiera un aspecto particularmente claro. Esta última etapa es fundamentalmente importante si se quiere cortar bajo terpineol. De no ser así debe cortarse lubrificando con etanol. Después de haber pasado por el benceno fenicado se pasa por terpineol anhídrido. Algunos prefieren montar el bloque sobre el portabloques únicamente después de haber pasado por terpineol.

El micrótomo de deslizamiento debe ser más cuidadosamente mantenido que el modelo Minot. Cuidadosamente limpiado después de cada sesión, antes de utilizarlo deben ponerse unas gotas de aceite en las guías de deslizamiento (el aceite es facilitado por el constructor). El ángulo de ataque de la cuchilla (pendiente de liberación) debe ser más grande que en el caso de los cortes de parafina, tanto más grande cuanto más dura sea la muestra. El ángulo de la cuchilla con relación al borde de ataque del corte que no existe en el caso de la parafina debe ser del orden de 10 y 40° en el caso de la celoidina. Este ángulo debe ser tanto mayor cuanto más duro sea el bloque. Se humedece el bloque, la cuchilla y un pequeño pincel plano con etanol o con terpineol, según la opción escogida. El pincel servirá para mantener los cortes sobre la hoja de la cuchilla y para trasladarlos a un pocillo con alcohol. Debe recordarse que el avance de la cuchilla debe hacerse con un movimiento lento y uniforme y la lubrificación con alcohol o terpineol debe hacerse de forma continuada, a ser posible con un frasco cuentagotas.

La ventaja de la lubrificación con terpineol es que no se secan tan fácilmente como los lubrificados con alcohol y pueden guardarse durante unos minutos sobre papel de fumar ordenadamente, a medida que se van obteniendo los cortes y así se consiguen series. El único inconveniente es que este procedimiento es más largo y más costoso. Para evitar un gasto exagerado de terpineol éste se recupera en un pequeño cristalizador colocado debajo del portabloques y se embadurnarán las partes de la cuchilla no usadas con vaselina pura para que los cortes no se adhieran a ella. Para trasladar los cortes sobre un portaobjetos albuminado y previamente secado se depositan sobre una hoja seca de papel de cigarrillo tras haberlos presionado suavemente para adherirlos y se trasladan sobre un portaobjetos humectado y calentado a 60°. El calentamiento extiende la albúmina a la vez que la coagula.

A continuación, se sumerge el conjunto en una mezcla de alcohol-cloroformo con lo que se desprende el papel.

Cortes en parafina

Tras haber dejado enfriar los bloques de parafina, al menos durante un día, ya pueden ser cortados. Debe tallarse cuidadosamente el bloque, eliminando la mayor parte de parafina de todos los lados; asimismo, hay que recortar la base antes de adherir el bloque al portabloques. El tallado se hace con un escalpelo, practicando pequeñas secciones a fin de evitar que se agriete el bloque. Puede también utilizarse un hilo de acero colocado sobre un pequeño arco y calentado durante 1 o 2 segundos a la llama o por efecto Joule con la ayuda de una pila. Los dos bordes alto y bajo del bloque deben ser totalmente paralelos para que la cinta que se forme se desenrolle correctamente. Es interesante que los lados verticales formen con los otros dos un ligero trapecio a fin de provocar la adhesión de los cortes a medida que se van obteniendo (fig. 145).

Se *adhiere* el bloque sobre el portabloques estriado mediante una capa de parafina líquida. Se recomienda para mejorar la adhesión calentar ligeramente el portabloques sobre una platina caliente. Se enfría con agua.

Se *empieza* a cortar con la ayuda de un escalpelo hasta que aparezca el material fijado e incluido.

Se *ablanda* la pieza así iniciada sumergiéndola de 1 a 12 días, según sus dimensiones, en agua destilada templada, a la temperatura de la habitación donde se encuentra el micrótomo.

Se *monta* el portabloques sobre su pinza (pinza

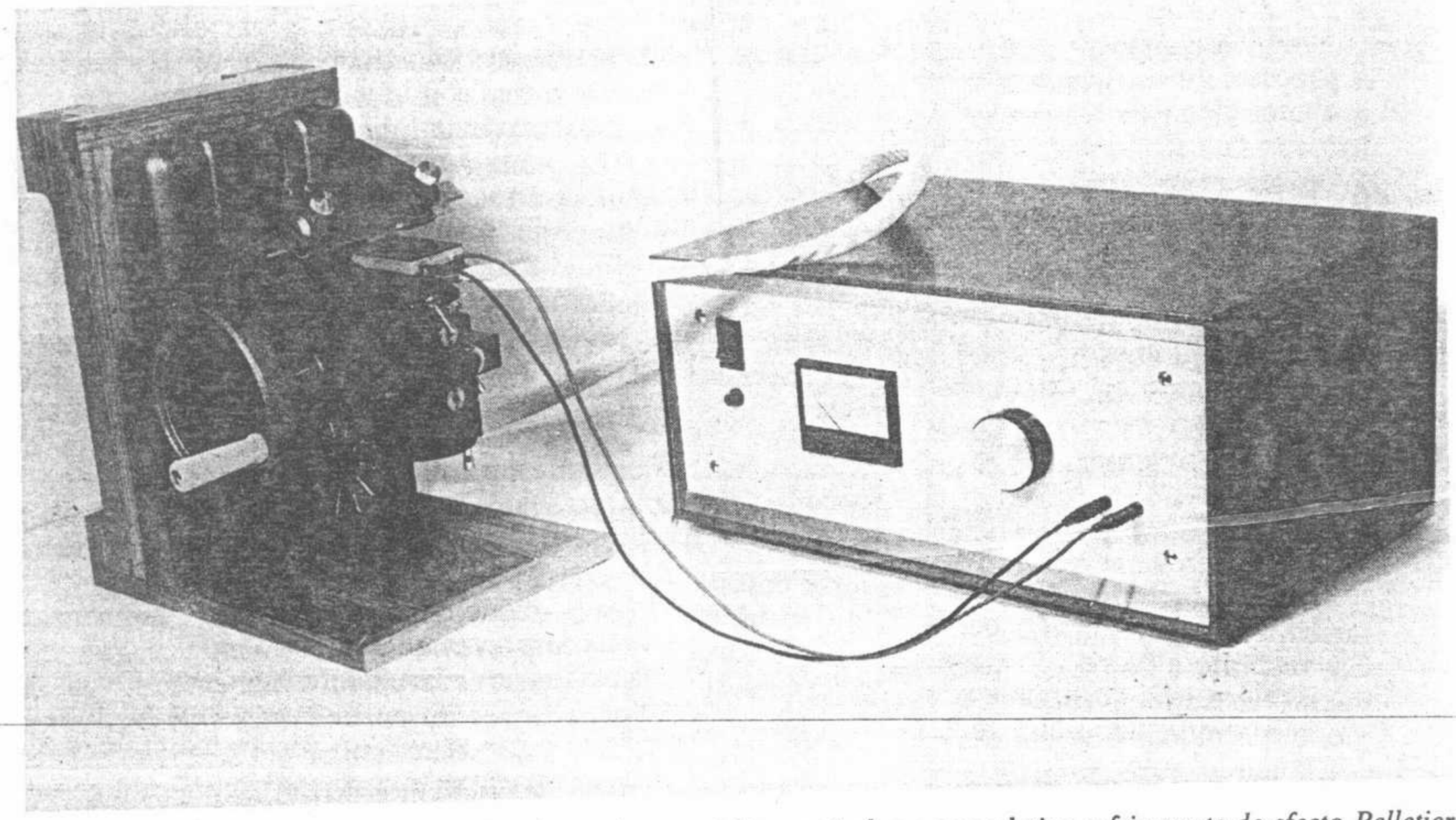


FIG. 144. — *Micrótomo de Minot: utilizado aquí en posición vertical con una platina refrigerante de efecto Pelletier.* Sin este accesorio el mismo micrótomo es utilizado, en posición horizontal, para obtener cortes de material incluido en parafina. Documento Stiassnie, S. N. M., París.

de Nápoles) y se inicia la *obtención de cortes seriados*.

Después de haber comprobado que el micrótomo está en buen estado mecánico (cf. p. 156) se acerca el bloque a las proximidades de la cuchilla y se procede a obtener los cortes seriados y se comprueba la ausencia de estrías, lo que indicaría un defecto de la cuchilla, así como el perfecto paralelismo de los bordes del bloque que asegurará una buena obtención de cintas de cortes seriados. La temperatura de la habitación donde se efectúan los cortes es un dato a tener en consideración para obtener cortes planos: se agrietan o se enrollan si la pieza es demasiado fría, se amontonan plegándose si la pieza es demasiado cálida. Se puede modificar la temperatura de la habitación o bien incluir el material en parafinas más blandas o más duras, atendiendo los casos. Por norma general debe haber una diferencia de temperatura del orden de 20° entre la temperatura de la habitación y el punto de fusión de la parafina utilizada. Una vez efectuadas estas verificaciones se ajusta la orientación de la cuchilla y se elige un determinado grosor de corte, así como una velocidad, compatibles con las condiciones de trabajo, calidad del bloque, ya que no siempre pueden determinarse de manera absoluta los parámetros que, de hecho, unos dependen de los otros.

Es la práctica, unida al conocimiento de su instrumento, lo que hace el buen microtomista.

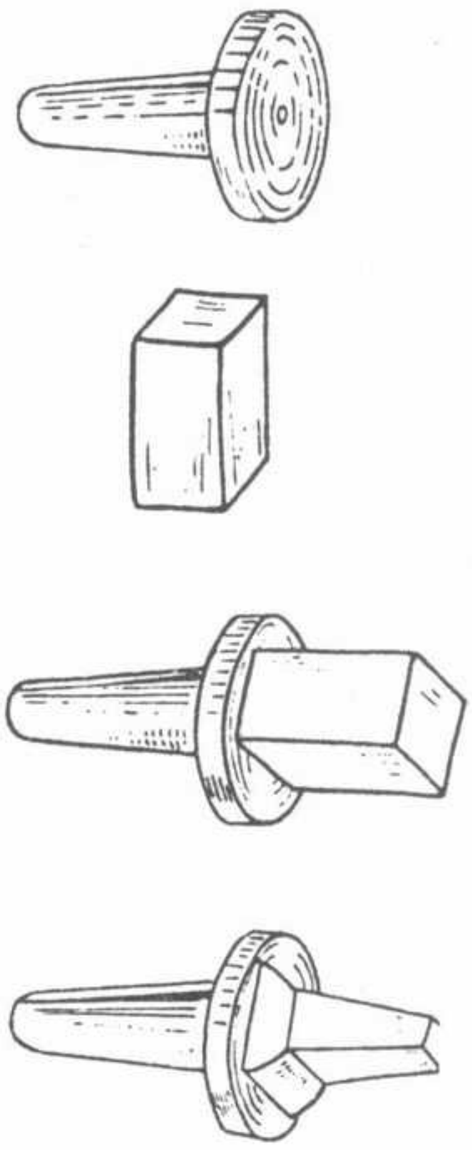


FIG. 145. — *Etapas en la confección y talla de un bloque de parafina y colocación sobre el portabloques del micrótomo, de arriba abajo.*

PLANCHADO Y ADHESIÓN DE LOS CORTES

Los cortes obtenidos con el micrótomo generalmente están plegados, sobre todo los procedentes de inclusión en parafina. Es por ello que

CORTES MALOS DE PARAFINA: CAUSAS Y SOLUCIONES

ASPECTO	CAUSA	SOLUCIÓN
Cortes vibrados (alternancia *en un mismo corte* de zonas gruesas y finas transversales)	Ángulo de ataque excesivamente grande con respecto al bloque de parafina	Enderezar la cuchilla, debe estar más paralela a la cara de corte del bloque
Alternancia más o menos regular de cortes de grosores distintos	Ángulo de ataque demasiado pequeño	Inclinar más la cuchilla (Defecto inverso al interior)
	Defecto de inmovilización de la cuchilla	Apretar los tornillos de sujeción de la pinza portacuchilla
	Defecto de la adhesión del bloque sobre el portabloques	Verificarlo y en algún caso volver a pegar el bloque
	Avance micrométrico	Hacer revisar el aparato por un técnico
Cortes exageradamente arrugados	Cuchilla mellada	Afilado o bien suavizado
	Parafina demasiado blanda para el espesor selecciondo de corte	Disminuir la temperatura ambiental, enfriar el bloque; si es necesario, volver a incluir con una parafina de punto de fusión más elevado; iniciar el bloque con cortes más gruesos si el tipo de trabajo lo permite
Los cortes se desintegran y sin embargo no tienen el aspecto indicador de una mala inclusión	Piezas demasiado duras	Disminuir el grosor de los cortes; este incidente indica también al tipo de ablandamiento que debe someterse al material, sumergiendo el bloque ya iniciado, en agua o bien en glicerina y alcohol a partes iguales
Los cortes se rompen, se desgarran y presentan aspecto tiznado, lo que indica una mala penetración del material de inclusión	Eliminación incompleta del alcohol de la deshidratación o mala inclusión	Aunque sin muchas esperanzas, intentar dar marcha atrás, volviendo a pasar la muestra por la parafina fundida, por el agente intermediario e incluso por el alcohol absoluto La introducción del bloque en agua está contraindicada
Los cortes se enrollan sobre la cuchilla y no se puede conseguir la cinta	Parafina demasiado fría para el grosor deseado para los cortes y para la temperatura de la habitación	Disminuir el grosor de los cortes Sacar con precaución el primer corte y ayudarlo a extenderse con una aguja, o mejor con un pincel; aumentar la temperatura del bloque y de la cuchilla; para ello, en ocasiones basta con soplar ligeramente sobre la zona de la cuchilla que pasa sobre el bloque para conseguir una pequeña elevación de temperatura En ocasiones, es conveniente colocar una lámpara encendida en las proximidades del bloque

CORTES MALOS DE PARAFINA: CAUSAS Y SOLUCIONES

ASPECTO	CAUSA	SOLUCIÓN
Los cortes parecen correctos, pero la cinta no se hace por falta de adherencia de los cortes entre sí	Parafinada demasiado fría para el espesor de corte escogido y para la temperatura de la habitación	Al igual que en el caso anterior, debe aumentarse la temperatura del bloque y de la cuchilla y después acelerar el movimiento de rotación
El material salta de la cinta de parafina	Es debido a una mala penetración de la parafina, heterogeneidad de las zonas externas de la pieza o bien inclusión hecha a temperatura excesivamente baja	Intentar cortar a menor velocidad; con la ayuda de un pincel intentar coloidonar la superficie del bloque antes de cortar; volver a incluir; debe considerarse el bloque desechable en el caso de que el centro de la preparación tenga un aspecto de tiza
El bloque arrastra consigo los cortes ya hechos	Atracción electrostática	Intentar descargar la cuchilla con una descarga eléctrica alternativa: encender muy cerca del bloque un mechero Bunsen o bien irradiar el bloque con radiaciones α (este es el mejor sistema pero dado el precio del generador resulta muy costoso). También se puede intentar pasar por la cuchilla una sustancia antiestática
	Ángulo de liberación demasiado pequeño	Inclinar la cuchilla
La cinta se curva	Acumulación de restos de parafina sobre la cara inferior del bloque	Vigilar la limpieza de los bordes del bloque
	Las caras superior e inferior del bloque no son paralelas	Volver a cortar el bloque dándole otra sección
La cinta aparece longitudinalmente estriada	Una desigualdad en el afilado de la cuchilla provoca una compresión asimétrica del bloque	Desplazar la cuchilla para evitar las mellas o bien recortar la superficie a cortar (reducir la dimensión de la cara correspondiente a la convexidad de la cinta).
	La sujeción del portabloques por parte de la pinza de Nápoles es desigual	Corregir dicha sujeción o piramidar el bloque de forma adecuada
	Afilado defectuoso	Nuevo afilado o bien suavizado de la cuchilla
	La cara de la cuchilla que está girada hacia el bloque presenta restos de parafina que rayan el bloque	Limpiar la cuchilla con la pulpa del dedo, en sentido ascendente
	Presencia de partes duras en la muestra	Eliminarlas con la ayuda de una aguja enmangada o una lanceta

deben plancharse antes de engancharlos al portaobjetos muy limpio y humedecidos. Generalmente, el agua es el líquido de extensión más frecuentemente usado.

Cuando se trata de *cortes de parafina* se puede proceder de dos maneras:

1.° Colocar sobre un portaobjetos una gran gota de agua que contenga albúmina glicerinada de Mayer y seguidamente colocar los cortes, la cara brillante por debajo, colocarlos en la estufa a 50° o sobre una platina calefactora a esta misma temperatura. Debe vigilarse que la parafina del corte no se funda, sólo debe ablandarse ligeramente. Puede sustituirse la albúmina por el agua gelatinada al 0,1 %.

2.° Llenar un cristalizador con agua a la que se le ha añadido diez gotas de albúmina de Mayer. Depositar sobre la superficie los cortes con la cara brillante hacia abajo. Colocarlo a la estufa a 50°, a esta temperatura los cortes se extienden y se pescan con un portaobjetos que se desliza en el agua, por debajo de los cortes y volviéndolo a sacar con los cortes, ayudándose con una aguja enmangada para situarlos correctamente. Se procede de la misma manera cuando se trabaja con la gelatina.

En ambos casos, de la extensión de los cortes se procede a eliminar el exceso de líquido por decantación. Posteriormente, se procede a desecar sometiendo el material a una corriente de aire de 40-50° o a la estufa de parafina a esta misma temperatura, sin que la parafina funda. Debe estar 15 días, si bien en muchas ocasiones permanencias de 48 horas a la estufa son ya suficientes. El corte debe quedar totalmente adherido en toda su superficie, lo cual se verifica mirando por la cara inferior: no debe haber quedado ninguna capa de aire entre el portaobjetos y los cortes, formando «espejo». Cuando las manipulaciones a que se someterán los cortes, sobre todo las soluciones calientes, alcalinas o ácidas, hacen peligrar la adhesividad de los cortes, fácilmente se despegan, en este caso recomendamos insolubilizar la albúmina de Mayer o la gelatina sometiéndola

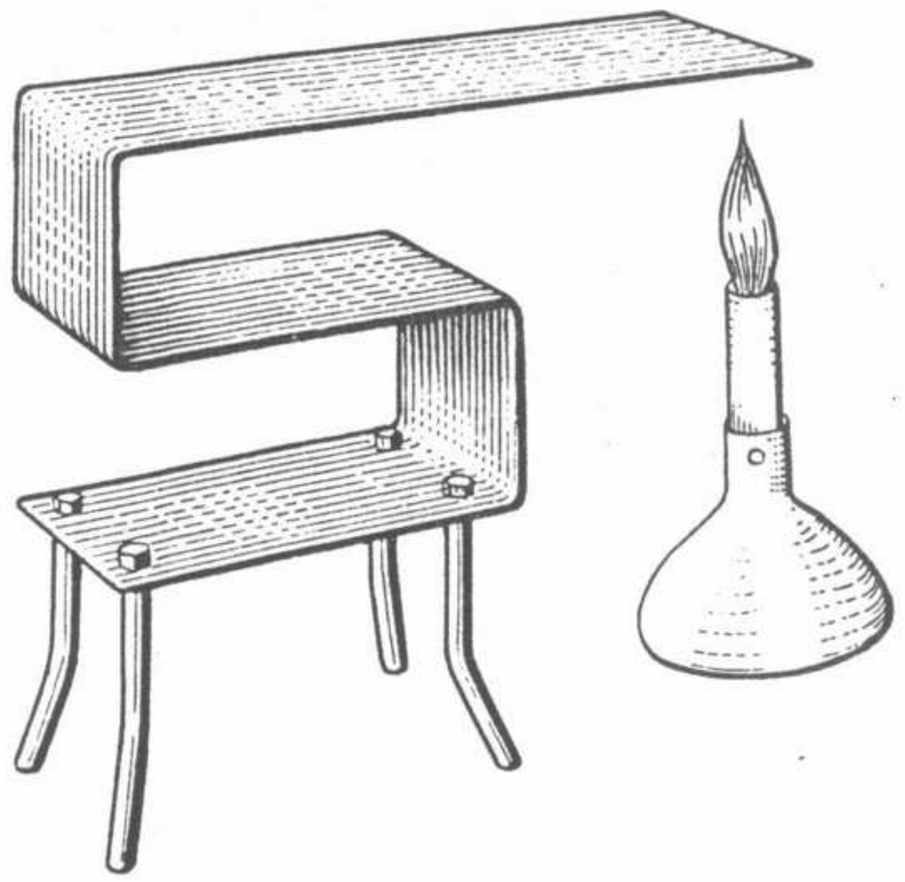


FIG. 146. — *Platina calefactora de Malassez*. El extremo derecho es calentado por un mechero de alcohol o de gas; se obtiene una distribución de temperaturas a lo largo de las S metálica. Documento Prolabo, París.

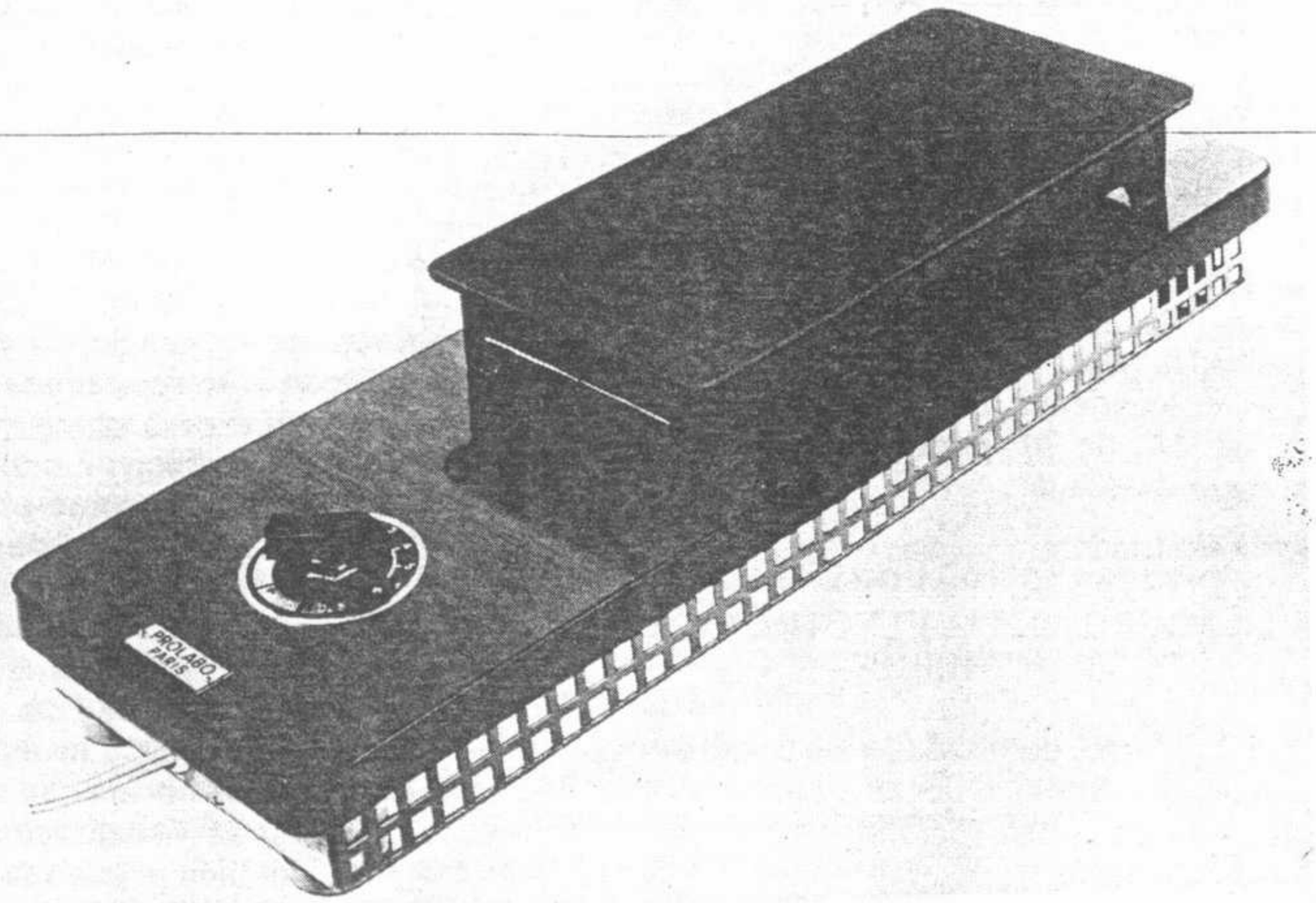


FIG. 147. — *Platina calefactora eléctrica de Policard; un reóstato permite establecer la temperatura deseada.* Documento Prolabo, París.

durante 5 minutos a vapores de formol, antes de proceder al desecado.

Cuando se trata de cortes mixtos: *Gelosa-parafina* se utiliza como líquido de extensión el agua albuminosa o el líquido de Ruyter: agua destilada: 8 ml + acetona: 2 ml + benzoato de metilo: una gota + albúmina glicerinada: tres gotas.

Para los cortes de *celoidina* esta operación es más delicada y más compleja. Se procede de la siguiente manera: se recogen los cortes siempre embebidos de alcohol o de terpineol sobre una hoja de papel de cigarrillo no engomado y no plegado, colocándola directamente sobre la cuchilla con la ayuda de un pincel. Varios cortes pueden ser transferidos sobre el mismo papel hasta formar una serie. Se conservan las series de cortes en una caja de Petri, en cuyo fondo se ha depositado un papel de filtro humedecido con alcohol de 70°. Seguidamente se adhieren los cortes a un portaobjetos untado con albúmina. Se escurre y se sumerge durante 10 minutos en esencia de girasol; para determinadas tinciones no es necesario eliminar la celoidina y utilizar los cortes así pegados tal cual o insolubilizados con vapores de formol.

Para los cortes con gelosa o gelatina se pega con un medio diluido.

Los cortes de inclusiones hechas con esterwax se extienden sobre agua y se deja evaporar sin decantar.

DESPARAFINADO PREVIA TINCIÓN

Los cortes de *parafina* pegados al portaobjetos deben generalmente desparafinarse antes de teñirlos. Para ello se sumergirán los portaobjetos sucesivamente en tres frascos de Borrel, figura 132, conteniendo un disolvente de la parafina: benceno, tolueno xilol o triclorestileno. A continuación, se pasan por tres frascos de Borrel que contienen etanol o metanol, seguido de un lavado de un cuarto de hora en agua. Este último paso debe omitirse en el caso de querer aplicar sobre los cortes un colorante alcohólico. Algunos autores recomiendan pasar los portas por una serie de graduación descendente de alcoholes, es decir: absoluto, de 90°, de 70° para pasarlos seguidamente al agua destilada.

CORTES ULTRAFINOS PARA LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Mientras los cortes destinados a ser estudiados con el microscopio fotónico tienen algunas micras de grosor, los que deben ser observados con el microscopio electrónico de transmisión deben tener únicamente unos centenares de angstroms (250 a 300 Å). Mientras los primeros se obtienen con cuchillas de acero deben usarse cuchillas de vidrio o de diamante para obtener los cortes ultrafinos. La confección de estos materiales de microtomía es tratada en la página 156.

Dada la finura del trabajo, la resolución del aparato con que se observarán los cortes debe trabajarse más que nunca con sumo cuidado, con máxima limpieza y estabilizar las condiciones de trabajo: estabilidad mecánica del soporte, libre de vibraciones, estabilidad de la temperatura de la habitación donde hay el micrótomo, debe haber una pantalla transparente entre el operador y el material a cortar donde se depositará el aliento del microtomista.

El bloque debe tallarse de manera que tenga forma de pirámide, ligeramente trapezoidal y fuertemente cónica. La cuchilla de vidrio está dotada de una cubeta con agua. La superficie a cortar no debe sobrepasar el milímetro cuadrado. El ángulo de ataque y la liberación del corte puede ser muy pequeña en el caso de los materiales incluidos en araldita o en epon y de mayores dimensiones en el caso de estar incluido en metacrilato. Se llena la cubeta con agua o con agua y un 10 % de acetona. Se hacen algunos cortes relativamente gruesos para asegurarse la regularidad de los cortes y se examinan en contraste de fases o en contraste interferencial para saber si se está cortando la región adecuada del material. Para ello, se procede a «pescar» los cortes que están flotando en la cubeta con agua mediante un palillo de madera. Los cortes forman cintas y el grosor de cada corte puede apreciarse con la ayuda de la escala de los colores de interferencia que hay a continuación, válida para cortes de índice 1,5 que estén flotando sobre el agua.

Gris	grosor inferior	a 600 Å
Plata		600 a 900 Å
Oro		900 a 1500 Å
Púrpura		1500 a 1900 Å
Azul		1900 a 2400 Å
Verde		2400 a 2800 Å
Amarillo		2800 a 3200 Å

Frecuentemente, a medida que se van obteniendo los cortes se repiramida el bloque, recordando que 1 mm^2 es la superficie adecuada para obtener cortes de buena calidad. En una cinta todos los cortes deben tener el mismo color, ya que deben tener el mismo grosor. Generalmente, los cortes son recogidos de la cubeta con su soporte definitivo: rejilla, hendidura, agujero, previamente desengrasados tras un lavado con etanol o con acetona durante 12 h. Para los trabajos más delicados se recubre la rejilla metálica con una delicada red de fibrina que soportará los cortes sin dificultar su visualización al microscopio electrónico. También puede usarse una membrana soporte de colodión o de formvar.

PREPARACIÓN DE LAS MEMBRANAS SOPORTE PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Limpiar los portaobjetos de vidrio con la mezcla sulfocrómica o con ácido clorhídrico alcohólico durante 24 h; enjuagar con etanol, secar y conservarlos resguardados del polvo.

Disolver 0,2 g de formvar en 100 ml de dicloroetano. Filtrar y conservar en frío. Calentar previamente a temperatura ambiente antes de utilizarlo. Coger uno por uno los portaobjetos y sumergirlos en la solución de formvar; dejar evaporar algunos minutos en un desecador de silicagel. A continuación, pueden seguirse dos sistemas: con la ayuda de una aguja se cuadricula la superficie del portaobjetos hasta tocar el vidrio, a 1 mm de los bordes, a continuación se sumerge oblicuamente el portaobjetos en cuestión en un cristalizador con agua hasta el borde, al que se le ha añadido unas gotas de acetona o de cloroformo. La membrana o los pequeños rectángulos de la membrana flotan sobre el agua. Al acabar la inmersión se deja caer el portaobjetos al fondo del cristalizador. Con una rejilla sostenida con unas pinzas curvadas se pesca el rectángulo de formvar. Si se ha escogido la segunda variante se depositan cuidadosamente las rejillas sobre la membrana dejando un cierto espacio entre ellas. Se saca el conjunto formado por la membrana de formvar y las rejillas colocadas sobre ella con la ayuda de un papel de cigarrillo que se coloca sobre las rejillas y seguidamente se retira del agua, también puede procederse con un portaobjetos en lugar del papel. Una vez extraído el papel del agua o el portaobjetos se coloca en una caja de Petri con las rejillas hacia arriba y se secan a 60°. Se cogen las rejillas una por una y se controlan las membranas con el microscopio de contraste de fases para desechar las que no están correctas: arrugadas, agujereadas o ausentes. Las rejillas preparadas de esta manera se conservan resguardadas del polvo y de la luz.

Para depositar los objetos es preferible pescarlos sobre una superficie líquida más que depositarlos sobre una gota de líquido conteniéndolos en suspensión sobre la rejilla. Cuando se evapora el líquido la tensión superficial tiende a aplicar los cortes sobre su soporte, lo cual puede ser una ventaja, pero esto puede ser también un inconveniente para los objetos frágiles. Se recurre entonces al método del punto crítico de Anderson (cf. p. 146).

El control de los grosores del formvar se hace con el mismo sistema adoptado para el control de los cortes, se observan los colores de interferencia, para aumentarlos es suficiente incrementar la concentración de la solución de formvar o, por el contrario, disminuirla para obtener membranas más delgadas.

FIJACIÓN-CONSERVACIÓN DE PIEZAS DE PEQUEÑO VOLUMEN

Frecuentemente, resulta muy interesante y útil conservar *in toto* piezas de pequeño volumen sin cortarlas para ser observadas a simple vista o con la lupa. La conservación de los colores tiene importancia en unos casos mientras que en otros casos no tiene apenas interés.

Se mejora la conservación de los colores de las flores, de los líquenes y de algunos hongos tratando los ejemplares con SO_2 gaseoso durante 1 a 2 días antes de conservarlos.

Se puede conservar en un medio líquido o bien incluir en una resina transparente. La conservación en un medio líquido es preferible, sobre todo cuando hay la posibilidad de sacar un pequeño fragmento y eventualmente cortarlo y teñirlo. La conservación sólida asegura una inalterabilidad de las piezas y su resistencia a muy numerosas manipulaciones, ya que si los bloques se rayan se pueden volver a pulir.

Inclusión en una resina orgánica

Toda pieza puede ser incluida en fresco, embalsamada o fijada. Hay que deshidratarla antes de incluir. Para fijar los colores se sumerge el objeto durante 2 a 3 días en agua azucarada al 15 % en gran exceso, con un cristal de fenol; después se fija y deshidrata al mismo tiempo por inmersión en etanol de 70°, la pieza puede conservarse allí durante mucho tiempo (5 a 10 años). Si no se desea conservar en medio líquido se pasa a alcohol de 95° renovado, se escurre y se sumerge durante 24 h en agua glicerinada al 30 %, protegido de la luz, salvo para las piezas muy pequeñas (10 a 20 min). Se escurre sobre un tejido absorbente durante 6 h, con ello la pieza está preparada para ser incluida.

La inclusión propiamente dicha se hace en una resina acrílica a la que le ha añadido un acelerador de la polimerización de un catalizador. En un gran Bécher se pesa por ejemplo 100 g de resina monómera y removiendo se van añadiendo dos gotas de acelerador, después 2 ml de catalizador; se elimina el gas con una tromba de agua, la mezcla está preparada para hacer el bloque. Endurece en unas 24 h a 20°.

Se habrán preparado moldes paralelepipédicos de una dimensión 1/3 superior a las dimensiones de la pieza; estos moldes puede ser de polietileno flexible (cubitos de hielo) en plastómeros de silicona (silasteno) de papel siliconado, en aluminio, en hojas impregnadas de vaselina. En el fondo del molde, 18 horas antes de hacer el bloque, se coloca una base clara u opacitada por carbón negro o de azul de Prusia. Se colocan seguidamente las piezas y se termina de llenar el molde

vertiendo la mezcla y procurando orientar las muestras antes que solidifique el medio, estando viscoso. Eventualmente, se elimina el gas mediante una tromba de agua. Se coloca el conjunto en un refrigerador, dado que la reacción de polimerización es exotérmica y no debe ser brusca, puesto que destruiría las piezas. Se saca el bloque del molde al cabo de una semana, se corta y se pulen las caras en medio acuoso con papel abrasivo hidrófugo de grano 100 a 600, por etapas sucesivas.

Inclusión en un gel de sílice. — Todas las inclusiones hechas en un gel obtenido a partir de silicato sódico no son permanentes, al cabo de poco tiempo se forma una película lechosa que se debe al carbonato de Na poco difusible. Locquin incluye los hongos en sílice vertiendo silicato potásico viscoso sobre el material colocado en un molde ancho y plano. Después de estar expuesto varios días al CO_2 del medio ambiente, el gel se forma y va endureciéndose progresivamente. Una vez solidificado se saca el bloque del molde y se sumerge el disco de sílice en el agua renovada cada semana durante varios meses para eliminar por difusión las sales de potasio que provocarían unas corrientes lechosas que permanecerían en el gel. Se talla el bloque dándole su forma definitiva antes de que quede excesivamente duro y se coloca en un bocal paralelepipédico lleno de agua y posteriormente se precinta, y se conserva de esta manera. El material se conserva de esta forma indefinidamente.

Si puede admitirse una cierta retracción puede dejarse el bloque para que se deshidrate al aire hasta completa vitrificación.

VIII. — MONTAJE DE LAS PREPARACIONES

LA PREPARACIÓN MICROSCÓPICA

Hacer una preparación microscópica generalmente consiste en encerrar el material a estudiar entre dos láminas de vidrio. De estas dos láminas, una sirve de soporte, el portaobjetos o simplemente *porta*, término que utilizaremos de forma preferente.

La otra lámina sirve para cubrir el material, es de un vidrio muy delgado, de unos 0,17 mm de grosor, se trata del cubreobjetos o simplemente *cubre*. Diremos pues que el material está montado entre portaobjetos y cubreobjetos; el término *montar* indicará pues la confección de una preparación microscópica lista para ser observada al microscopio.

Existen *portaobjetos* de diversas dimensiones, utilizamos exclusivamente portas de 76×26 mm. Los aficionados utilizan en ocasiones portas esmerilados, de bordes redondeados, son los mejores y de vidrio más blanco. En los laboratorios donde se trabaja mucho y se consumen muchos portas es preferible utilizar los corrientes, no los esmerilados, que son mucho más baratos y van igual de bien. Téngase en cuenta que el vidrio blanco es más fusible y más alcalino que el vidrio verde.

Por el contrario, es necesario tener una completa colección de *cubreobjetos* de diferentes dimensiones, según el tipo de muestras a montar. Los formatos más corrientes son 18/18, 22/22, 22/32 mm. Estos cubreobjetos son cuadrados o rectangulares; existen también cubres redondos, éstos se reservan para casos especiales. Debe escogerse el tamaño del cubre según la superficie del material a recubrir. Los dos formatos cuadrados son convenientes para montar objetos aislados o elementos en suspensión en un líquido. Los cubreobjetos de mayor tamaño, los rectangulares, se utilizan principalmente para montar cortes.

Un hecho importante es el *grosor de los portas y de los cubreobjetos*. Es importante tener siempre unos de tamaño estándar. Si son excesivamente delgados aumenta la fragilidad sin repercutir en la calidad de la observación microscópica. Con respecto a los cubreobjetos deben acercarse al máximo al valor estándar por el que están corregidos los objetivos de mayor aumento. Al estudiar las propiedades de los objetivos ya se ha indicado cuáles eran los inconvenientes de trabajar con cubres demasiado gruesos o demasiado delgados y su influencia sobre la nitidez de las imágenes. Asimismo se indicó cuáles eran los principales procedimientos que permitían medir el grosor de los cubreobjetos.

Más adelante indicaremos cuáles son los procedimientos a seguir para *limpiar* los portas y cubreobjetos. Señalemos ahora que incluso los nuevos, no pueden utilizarse directamente. Siempre están impregnados de polvo y de grasa, es porque deben sumergirse al menos una vez en alcohol. Portas y cubres se tienen en alcohol y de ahí se sacan a medida que se van necesitando, se secan entonces con un paño limpio, suave y desprovisto de pelos. Se dispone sobre la mesa de trabajo una

serie de frascos con tapón esmerilado y se van sacando los portas a medida que se van necesitando.

El material puede ser montado entre portaobjetos y cubreobjetos en aire, siendo este caso el menos frecuente, o casi siempre en un medio líquido. Entre éstos, los unos solidifican bien sea por enfriamiento o por evaporación, mientras que otros son soluciones acuosas. En el primer caso basta con dejar enfriar o secar la preparación; en el segundo caso es necesario cerrar bien la preparación, para evitar la evaporación del líquido de montaje y la posterior desecación del material. Este cierre hermético se consigue cementando la preparación con laca o cemento. Más adelante estudiaremos con detalle estos procedimientos de cementado.

Una vez confeccionada la preparación debe etiquetarse. La *etiqueta* será preferentemente pegada a la izquierda de la preparación. Si con una etiqueta no basta para escribir toda la información, se pegará otra etiqueta a la derecha. Estas etiquetas llevarán el nombre del animal o de la planta, el del órgano, eventualmente la técnica de fijación adoptada, la técnica de tinción y el tipo de montaje y, finalmente, la fecha en que se ha confeccionado.

No podemos enumerar todas las variantes existentes de preparaciones microscópicas: las estudiaremos metódica y completamente en los capítulos siguientes.

Cabe hacer algunas consideraciones sobre la *necesidad del cubreobjetos*. Los principiantes están tentados frecuentemente de omitir su utilización, sobre todo en el caso de las observaciones en fresco y se extrañan de no poder conseguir una imagen nítida de lo que observan en estas condiciones, incluso trabajando con objetivos de pequeño aumento. Únicamente hay un caso en que no es imprescindible colocar cubreobjetos, se trata de las extensiones desecadas, pero debe tomarse la precaución en este caso de cubrirlas con una gota de aceite de inmersión para dar a la preparación una transparencia suficiente y una homogeneidad óptica necesaria para la buena marcha de los rayos lumínicos.

En todos los casos el objeto debe colocarse entre el portaobjetos y el cubreobjetos a fin de que la preparación sea uniformemente plana y para que la lente frontal de los objetivos de gran aumento no toque el líquido. El hecho de que las preparaciones sean planas es muy importante desde el punto de vista de la calidad de la imagen como en la facilidad del enfoque. Se sabe que una gota de líquido colocado sobre un portaobjeto puede extenderse fácilmente o bien formar un disco esférico, según el vidrio esté mojado o no, ello es debido a la acción capilar. En el primer caso el líquido se extiende y el objeto no queda cubierto, en el segundo de los casos habrá juegos de luces debido a las desiguales refracciones y reflexiones. El cubreobjetos tiene por misión retener el líquido bajo forma de una capa de conveniente grosor, con superficies planas y rodeando completamente el objeto. Es muy importante que el cubre esté bien horizontal y paralelo al portaobjetos. Cuando se trata de montar objetos un poco gruesos e irregulares, se obtiene esta horizontalidad mediante pesos de diversas naturalezas (ver más adelante).

Cubreobjetos irrompibles. — Pranter en 1901 aconsejó la sustitución de los cubreobjetos de vidrio por láminas de gelatina por cuestiones de economía, para las preparaciones destinadas a la enseñanza. Desde la aparición del *celofán* este procedimiento sólo tiene interés histórico. El empleo del celofán como sustitutivo de los cubres fue dado a conocer por Landau en 1917; ofrece unos resultados mucho mejores que la gelatina, dada su insolubilidad para con el agua y en otros muchos disolventes. Sólo es atacable ligeramente por los ácidos o los álcalis concentrados. Su empleo ha sido pues recomendado y es bueno de aconsejar. El celofán no solamente tiene interés como cubreobjetos, sino como medio de cultivo de hongos, como lámina que pueda sustituir a las de yeso utilizadas en los aparatos de polarización, como sustitutivo del cuarzo a causa de su transparencia a la luz ultravioleta, etc.

Sustitución de los cubreobjetos por una capa de resina sintética. — E. de Angelis (1945) sumerge los portaobjetos portadores de cortes o de extensiones teñidas en una solución de *acroloide* B 72 en un 40 % de tolueno, los escurre y los seca; si la capa parece excesivamente delgada, se puede sumergir la preparación varias veces.

P. Bourdan emplea con la misma finalidad un barniz celulósico.

Actualmente, se encuentran estos productos o similares en forma de spray, pero sus resultados no son tan regulares.

Limpieza de los portaobjetos y cubreobjetos. — **Portaobjetos nuevos.** — Para los trabajos delicados y sobre todo para las extensiones de sangre es preferible utilizar portas nuevos. Para las extensiones se requieren portaobjetos secos, para lo cual se desengrasan con alcohol y al sacarlos se secan con un paño fino que no deje pelusa, el algodón, pero sobre todo el hilo usado son ideales para estos menesteres. Cuando se limpian con antelación a su uso, deben guardarse envueltos con papel blanco o con papel higiénico. De esta manera quedan protegidos del polvo y únicamente se abre el paquete en el momento de hacerlos servir.

Para pegar los cortes pueden utilizarse portas recién salidos del agua, con lo que nos ahorramos su secado y sus inconvenientes, ya que siempre se engrasa algo el porta aparte de la pérdida de tiempo que representa. P. Masson aconseja lo siguiente: sumergir los portaobjetos nuevos en una mezcla formada por 9 partes de alcohol de 90° con 1 parte de ácido clorhídrico o nítrico, posteriormente se lavan con agua corriente frotándolos enérgicamente con la yema de los dedos, con precaución de no cortarse. Finalmente, se sumergen en agua destilada y sólo se sacan de allí en el momento de pegar los cortes. El desengrasado es perfecto y la adhesión remarcable.

Para extender los líquidos destinados a pegar los cortes debemos recordar la facilidad con que se extienden los líquidos sobre el vidrio previamente flameado. Lo que es un inconveniente para los cultivos celulares aquí es una ventaja. Es

decir, para la limpieza de los portaobjetos puede procederse al flameado de los mismos: debe hacerse con una llama que no dé humo.

Portaobjetos usados. — Su limpieza es mucho más difícil. Cuando se trata de preparaciones montadas con bálsamo, sobre todo si hace tiempo que están hechas, resulta más económico tirar los portaobjetos que limpiarlos para recuperarlos, dado que el tiempo que debe emplearse y el precio de los reactivos es superior al de los portaobjetos en cuestión. Sin embargo, el Dr. Braudet (Utrecht) ha indicado *un procedimiento sumamente sencillo y práctico*. Se tiran los portaobjetos usados en un recipiente de boca ancha con tapón esmerilado que contiene una mezcla a partes iguales de agua, alcohol de 95° y xilol. Se agita de vez en cuando y según las necesidades se van sacando los portas y cubres para secarlos con un paño bien limpio. Resulta también muy útil lavarlos con mezcla crómica y posteriormente con abundante agua corriente para finalmente pasarlos al alcohol de 96°.

Cubreobjetos. — Se siguen los mismos procedimientos que con los portaobjetos, pero debe tenerse en cuenta su fragilidad, también deben tomarse precauciones para su secado. Algunos autores recomiendan secarlos con una sola mano, entre el pulgar y el índice; pueden también secarse con la ayuda de las dos manos, sosteniéndolos por los lados con el pulgar y el índice izquierdo.

En este caso, es imprescindible lavarlos con alcohol clorhídrico, ya que en muchas ocasiones están recubiertos de un barniz blanquecino adhesivo. Seguidamente se conservan en alcohol normal hasta el momento de su utilización.

Alteraciones de los portaobjetos y de los cubreobjetos. — En Europa los portaobjetos y cubreobjetos se conservan bastante bien, aunque estos últimos en ocasiones se alteran hasta tal punto que no pueden aprovecharse, aunque se mantengan en sus cajas originarias.

En los *países tropicales* estas alteraciones suceden con mayor rapidez: en contacto con la atmósfera cálida y húmeda, la desvitrificación puede ser bastante intensa hasta el punto de convertir la superficie del vidrio totalmente opalescente y de esta forma inutilizar no sólo los cubreobjetos, sino también los portaobjetos.

En algunos casos la pátina blanca que se forma sobre los portas y cubreobjetos puede eliminarse por la acción de ácidos: un lavado con alcohol acidulado por ácido acético es suficiente para que vuelvan a ser transparentes.

Hay pocos sistemas que vayan realmente bien y sean prácticos para evitar la desvitrificación: ante todo debe adquirirse portas y cubres de primera calidad, cuanto menos alterables mejor. Pueden asimismo embadurnarse los cubreobjetos con esencia de girasol o con aceite de parafina. Este sistema es muy eficaz pero requiere ser seguido de una limpieza muy primorosa, en ocasiones difícil de llevarse a cabo si no se dispone del disolvente apropiado. La conservación en cajas metálicas herméticamente cerradas da buenos resultados.

Sénevet llega a recuperar cubreobjetos alterados tras bañarlos durante un tiempo variable en una solución de alumbre férrico al 3 %, frotándolos suavemente entre el pulgar y el índice hasta la desaparición total de la opacidad. Se seca sin lavar y se conserva en alcohol.

MEDIOS DE MONTAJE TEMPORAL

Líquido mercúrico de Gilson. — Alcohol de 60°: 60 ml + agua: 30 ml + ácido acético diluido al 20 %: 2 ml + 0,5 g de cloruro de mercurio.

Cloruro cálcico en solución acuosa saturada es un excelente medio de montaje acuoso que tiene la propiedad de no evaporarse en contacto con el aire. Puede utilizarse para montar piezas celulósicas y quitinosas, debe evitarse en el caso de que el órgano pueda contraerse bajo la acción de un líquido hipertónico.

El acetato potásico en solución acuosa saturada tiene las mismas propiedades que la solución anterior.

Hidrato de cloral, puede usarse desde una solución al 1 % hasta una que sea saturada, en función del objeto que se quiera estudiar. La solución saturada se usa con frecuencia para montar hongos (hifas y esporas) mientras que la solución al 2,5 % se utiliza preferentemente para montar copépodos.

Medios a base de glicerina. — El mejor es la glicerina pura; cabe subrayar que algunas formas de carbonato cálcico se disuelven con la glicerina, por lo que en este caso se debe evitar este medio de montaje. Cuando se emplea la glicerina debe cementarse bien la preparación, bien sea con gelatina glicerinada o con laca o con parafina fundida.

Lactofenol (según fórmula de Amann):

fenol:	20 g
ácido láctico:	20 g
glicerina:	40 g
agua:	20 cc

Albúmina mercúrica (líquido):

clara de huevo:	15 ml
cloruro mercúrico:	0,5 g
cloruro sódico:	4 g

Después de haberlo filtrado, este líquido debe conservarse al frigorífico. Es particularmente recomendado para el estudio de células ciliadas.

Cloral-lactofenol:

hidrato de cloral:	20 g
fenol:	10 g
ácido láctico:	10 g

Es un medio miscible en agua.

Cloral lactofenol salicilado. — Es un buen ablandante e hincha enérgicamente las estructuras:

hidrato de cloral:	40 g
fenol:	40 g
ácido láctico:	20 g
salicilato sódico:	10 g

Lactocloral:

agua:	10 g
glicerina:	10 g
ácido láctico:	20 g
formol:	5 g
ácido acético:	2 g
hidrato de cloral:	5 g

Lactofenol cúprico. — Recomendado para el estudio de las criptógamas vasculares:

lactofenol:	50 g
agua:	95 g
cloruro cúprico:	2 g
acetato de cobre:	2 g

Clorofenol:

hidrato de cloral:	40 g
fenol:	40 g
agua:	40 g

Cloralclorofenol:

hidrato de cloral:	40 g
monoclorofenol:	40 g
agua:	40 g

Timol. — Solución acuosa saturada. Debe dejarse reposar el líquido un mes antes de emplearlo.

Salicilato de metilo: puro.

Alcohol polivinílico: puro o en solución acuosa diluida.

Glicerina borada. — Disolver borato sódico hasta saturación en la glicerina. Se aumenta el índice de refracción de la glicerina de forma considerable. También puede usarse el cloruro de cadmio o el yodato de zinc.

Cloruro cálcico en solución acuosa saturada.

Jarabe de azúcar en solución acuosa al 7 % + fenol: 1 %, o en un hidrato de cloral al 5 %.

Glicerina yodomercúrica. — Yoduro de mercurio: 65 g + IK: 50 g + glicerina: 25 g. Sirve también como medio denso para las separaciones por centrifugación.

Aceite de parafina puro.

Yodogliceroclorai:

Yodo:	0,1 g
IK:	1 g
hidrato de cloral:	5 g
glicerina:	5 g
agua:	100 ml

MEDIOS DE MONTAJE PERMANENTES

Recomendaciones generales. — Para elegir el método y el medio de montaje adecuado para cada caso deberán tenerse en cuenta las siguientes consideraciones:

1.° El montaje al desnudo, es decir, *al aire* será siempre recomendado en el caso de hacer observaciones por reflexión de materiales muy opacos, es decir, con iluminación incidente.

2.° El medio de montaje *hidrosoluble* no garantiza una longevidad tan larga como los medios de montaje no hidrosolubles, como pueda ser una resina. Sin embargo, ofrece una serie de ventajas: mayor rapidez, menor índice de refracción, no debe someterse el material a una previa deshidratación, menor retracción, se conservan mejor algunas tinciones. Sin embargo, casi obligatoriamente debe cementarse la preparación.

3.° Distinguiremos dos tipos de montaje *en las resinas*: las que admiten las muestras recién salidas del alcohol de 96° y las restantes, tipo bálsamo del Canadá que únicamente admiten muestras totalmente deshidratadas. Las resinas del primer tipo son preferibles al bálsamo, máximo si se tiene en cuenta que éste, al no ser totalmente neutro, a la larga destiñe las estructuras. Las ventajas de este método son: una gran longevidad de las preparaciones montadas con este sistema, mayor resistencia a los golpes, a las variaciones de temperatura y a la humedad.

Basándonos en otro criterio, distinguiremos otras dos categorías de resinas: las que se solidifican hasta el centro de la preparación y las que permanecen viscosas en el centro, como es el caso del bálsamo del Canadá. En el primer caso, las muestras montadas con este sistema no tienen ningún riesgo en desplazarse, máximo si se guardan en bandejas; una vez secas las preparaciones es imposible desplazar el material, mientras que esto es posible cuando se monta con otros medios, por ejemplo con algunos hidrosolubles al calentarlos suavemente o bien los que están montados con bálsamo del Canadá presionándola ligeramente con una aguja enmangada.

Medios de montaje hidrófilos

Gelatina glicerinada (glicerina gelatinada):

gelatina:	7 g
agua:	42 ml
glicerina:	50 ml
ácido fénico o alcanfor:	1 g

Hacer hinchar la gelatina en agua antes de disolverla en caliente, filtrar sobre lana de vidrio. Añadir alumbre de cromo al 1 % al medio o insolubilizarlo añadiendo una gota de formol después de haber montado la preparación. Precaución: la glicerina puede alterar algunas impregnaciones metálicas.

Goma de cloral:

agua destilada:	50 ml
hidrato de cloral:	50 g
glicerina:	20 ml
goma arábiga:	30 g

Añadir 0,50 g de clorhidrato de cocaína si se utiliza para montar muestras vivas. Disolver el cloral en frío, añadir la glicerina y sumergir la goma colocándola en una bolsita de gasa o muselina hasta que se disuelva totalmente. Evitar la oxidación por acción del aire.

Cloral gelatinado. — Se trata de la gelatina glicerinada, a la que se le ha añadido un 9 % de hidrato de cloral.

Jarabe gomoso de Apathy. — Goma arábiga + azúcar de caña + agua a partes iguales en peso + vestigios de formol para su conservación y evitar que se formen mohos. Se diluye con un volumen tres veces superior de agua cuando se trata de montar piezas muy frágiles y se deja concentrar por evaporación antes de colocar el cubreobjetos. Los extremos se solidifican perfectamente, por lo que no es necesario cementar la preparación.

Jarabe de levulosa. — La misma fórmula anteriormente mencionada sustituyendo la glucosa del azúcar de caña por la levulosa y el fenol por el alcanfor. No cristaliza nunca.

Polietilen glicol-hidroxietil metacrilato. — Consultar los textos de microscopia electrónica.

Alcohol polivinílico. — Con un 15 % de agua debe disolverse al baño maría a 80 °C.

Polivinil-lactofenol:

Alcohol polivinílico 15 % acuoso:	56 g
ácido láctico:	22 g
fenol:	22 g

Jarabe de glucosa mercúrico. — Solución acuosa de bicloruro de mercurio al 8 %: 35 ml

goma arábiga:	20 g
glucosa:	10 g

Debe disolverse en frío.

Glucosa alcohólica. — Espesar al baño maría una solución acuosa de glucosa y añadir alcohol alcanforado a 60° hasta obtener la viscosidad deseada y añadir un poco de glicerina. Debe cementarse la preparación, dado que este medio es hidrosoluble.

Goma salicílica:

ácido salicílico:	2 g
bórax:	1 g
glicerina:	15 g
goma arábiga:	10 g
agua:	15 g

El sorbitol (Karion F) de fórmula desconocida es un buen medio de montaje.

Polietilen glicoles (Aquax), funde a los 54 °C.

Gelatina cádmica. — Puede incrementarse el índice de refracción de la glicerina disolviendo en ella cloruro de cadmio con sulfocarbonato de zinc o con yodato de zinc a saturación, siendo el índice de partida de 1,46 y puede llegar a alcanzar 1,54, 1,51 y 1,56.

Gelatina glicerinada con hidrato de cloral a partes iguales. Mezclar cuidadosamente y añadir unos cristales de hidrato de cloral hasta que el medio aumente en un 50 %. Calentar para disolver. Este medio es preferible al de la gelatina glicerinada cuando se desea un índice de refracción elevado.

Gelatina pícrica fenicada.

Silicato de sodio o de potasio.

Goma de acacia al cloral.

Medios miscibles en alcohol

Trementina de Venecia disuelta en alcohol de 96°, admite muestras procedentes del alcohol.

El Euparal: mezcla de sandaraco, camsal, eucalipto y paraaldehído. Admite muestras procedentes del alcohol de 80° o del de 96°. Recomendado para montar cortes en celoidina, $n = 1{,}483$. Colocando vestigios de una sal de Cu intensifica las tinciones con hematoxilina.

Resina mastic: admite muestras procedentes del alcohol de 96°. Debe calentarse una vez colocado sobre el cubreobjetos.

Bálsamo alcohólico. — Bálsamo del Canadá sólido disuelto en etanol absoluto. Admite piezas procedentes del alcohol etílico absoluto. Tener precaución con el aliento, ya que forma una pátina.

Fenoformol: resina fenol-formólica disuelta en alcohol de 96° hasta saturación.

Bálsamo al dioxano. — Bálsamo del Canadá disuelto en dioxano. Admite las muestras procedentes del dioxano o del alcohol de 96°.

Aceite de anilina: se utiliza para montar muestras extremadamente delicadas pero no debe usarse en el caso de que el material hubiera sido fijado con soluciones a base de osmio. A la larga, el aceite se altera, lo cual se traduce porque el líquido se vuelve pardusco y hay que destilarlo para que vuelva a adquirir su transparencia inicial. Puede utilizarse con alcohol o con xilol; sin embargo, las mezclas complejas con el lactofenol, el clorofenol o el clorolactofenol son mucho mejores.

Creosota, a pesar de su olor tan penetrante puede usarse para las muestras incluidas en celoidina.

Aceite de bergamota: a pesar de ser menos refringente también puede ser utilizado siempre y cuando se tenga en cuenta que disuelve algunas inclusiones lipídicas.

Medios de montaje resinosos, miscibles en hidrocarburos bencénicos

Bálsamo del Canadá, n = 1,54. Ha sido sustituido por otra serie de medios que presentan mayores ventajas. Debería eliminarse de la técnica histológica. A la larga amarillea, no es químicamente neutro, destiñe o altera numerosas tinciones. El bálsamo alcohólico es preferible al disuelto en benceno que se adquiere en el comercio. El bálsamo disuelto en dioxano es todavía mejor.

Resina Dammar, n = 1,53. Admite las muestras procedentes del xilol. Es mucho más barato que el bálsamo y no presenta sus inconvenientes.

Diversas resinas sintéticas. — Cedax, De PeX, Lustrex, Lustron, Styrax, Pleurax, Lurifax, Clarite, Hyrax, Liquidambar, Cumarona.

Resina de para-cumarona-indena, en solución bencénica.

Aceite de semilla de adormidera, n = 1,46.

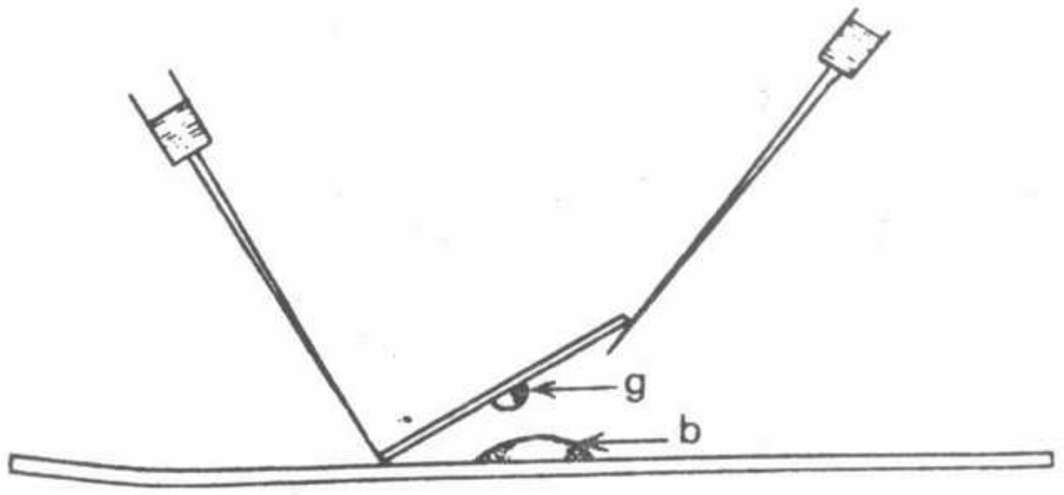


FIG. 148. — *Colocación de un cubreobjetos para el montaje en bálsamo:* g, esencia de girasol sobre la muestra; b, gota de bálsamo; si se puede, es siempre preferible operar de esta forma, los cortes en general se depositan sobre el portaobjetos y no sobre el cubreobjetos, en este caso invertir las dos gotas, g y b.

Goma de yema de castaño, n = 1,49.

Bálsamo de Camsal: disuelto en alcohol propílico, n = 1,478. Disuelto en alcohol isobutílico tiene un índice de n = 1,485.

Euparal. — Indudablemente, es la mejor fórmula a base de sandaraco. Es preferible comprar el medio de montaje en el comercio. Su índice de refracción es del orden de 1,404; en el caso de añadirle una pequeña cantidad de sales de cobre tiene la propiedad de intensificar la tinción con hematoxilina. Para las preparaciones delicadas este medio de montaje debería ser el rutinario, sustituyendo al bálsamo del Canadá.

Aceite de cedro. — A pesar de las cualidades que mencionamos a continuación: buena penetrabilidad, no ejerce efecto de retracción sobre las estructuras que actúa, debería eliminarse de la técnica histológica por la fluorescencia que presenta, que es incluso excitada por las radiaciones de corta longitud de onda del espectro visible y que confiere a la imagen una luz parásita que provoca una pérdida de nitidez. A la larga produce unos depósitos filamentosos o nebulosos. Recordemos que existen dos variedades de aceite de cedro, el espeso y el fluido, que difieren lógicamente por su consistencia a la vez que por su índice de refracción.

Aceite de acacia, difícil de conseguir en ocasiones, tiene un índice de refracción ligeramente superior al de los anteriores. Es un excelente medio de montaje.

Esencia de trementina: debe desecharse dada la gran contracción que provoca sobre las muestras.

Aceite de ricino.

ÍNDICES DE VISIBILIDAD EN LOS MEDIOS DE MONTAJE

Se define el índice de visibilidad de un objeto de índice de refracción *n'* montado en un medio de índice *n* por la fórmula siguiente:

$$I_v = |n' - n|$$

Generalmente se admite que el sílice de las diatomeas utilizadas como preparaciones test de resolución tienen un índice medio n' = 1,43 y que las proteínas deshidratadas de la mayoría de los cortes histológicos tienen n" = 1,35.

La tabla siguiente resume los índices de refracción de los principales medios de montaje con relación a los índices de visibilidad del sílice y de las proteínas.

Medio	*Índice* n_{D20}	*Visibilidad Sílice*	*Visibilidad Proteína*
Gelatina glicerinada	1,47	0,04	0,22
Agua	1,333	0,10	0,017
Tiocarbonato de Zn en glicerina	1,501	0,07	0,15
Cloruro de cadmio en glicerina	1,514	0,08	0,16
Yodato de Zn en glicerina	1,514	0,08	0,16
Aceite de cedro	1,515	0,085	0,165
Goma Dammar	1,520	0,09	0,17
Bálsamo del Canadá	1,54	0,11	0,19
Gelatina glicerinada	1,47	0,04	0,22
Aceite de anilina	1,580	0,15	0,23
Bromoformo	1,59	0,16	0,24
Styrax	1,60	0,17	0,25
Yodobenceno	1,62	0,19	0,27
Bálsamo de Tolú	1,640	0,21	0,29
Sulfuro de carbono	1,647	0,21	0,30
Monobromuro de naftaleno	1,658	0,228	0,31
Yoduro de Hg y K, acuoso	1,68	0,25	0,33
Aire	1,0	0,43	0,35
Cloruro de estaño en gelatina glicerinada	1,7	0,27	0,35
Yoduro de metilo	1,743	0,31	0,39
Sulfuro de carbono sulfuroso	1,75	0,32	0,40
Yoduro de Hg y K glicerinado	1,78	0,35	0,43
Yoduro de metilo sulfurado	1,787	0,35	0,44
Sirax	1,81	0,38	0,54
Hyrax	1,822	0,39	0,55
Sulfuro de C fosforado	2,10	0,67	0,75
Rejalgar	2,4 a 2,54	0,97 a 1,11	1,0 a 1,2

Cabe señalar que el montaje en aire imposibilita la observación de las preparaciones con los objetivos de inmersión.

Los índices de refracción cambian frecuentemente atendiendo al grado de pureza del producto y a la procedencia de los constituyentes; los valores anteriormente mencionados son a título orientativo.

CEMENTADO: BETUNES Y BARNICES

Los betunes y barnices sólo son necesarios para evitar la evaporación de los medios de mon-

taje líquidos o semilíquidos, así como para sellar las cámaras de observación o de otros accesorios.

Resinas-lanolina de Rondeau de Noyer. — Casi todas las resinas pueden disolverse con lanolina en una proporción de 8 partes de resina y 4 partes de lanolina anhidra. Se recomienda: el celofán, la resina de copal, la resina Dammar. Deben aplicarse con una pieza metálica caliente.

Goma laca en solución en etanol absoluto.

Betún de Judea de los ópticos. — Es el mejor de todos, aunque debe extremarse la limpieza del vidrio sobre el cual se aplica el betún. Se adhiere mal sobre las superficies humedecidas por agua, o por lactofenol, etc.

Mastic para sellar. — Caotchu claro: 20 g + talco: 20 g + parafina fundida a 50°: 12 g. Aplicar en caliente. Resiste el alcohol.

Cera de colofonia. — Cera: 20 g + colofonia o resina Dammar: 80 g, fundidas juntas, aplicar en caliente. Puede añadirse un 1 % de esencia de trementina de Venecia o un 10 % de sebo.

Cemento de Apathy. — Fundir conjuntamente a partes iguales parafina pura y bálsamo del Canadá seco. Aplicar en caliente.

Vaselina. — Cuando se desea cementar temporalmente para evitar la evaporación es muy conveniente usar la vaselina. Deben evitarse las vaselinas perfumadas y tóxicas.

Laca de uñas. — Se trata de un colodión al que se le han añadido pigmentos. Es fácil de aplicar, seca muy rápido. No siempre se adhiere bien y no es suficientemente impermeable como para asegurar una larga conservación.

Pegamento Scotch para vidrio. — Hacemos las mismas observaciones que para la laca de las uñas, pero en este caso la adherencia es perfecta cuando el vidrio está completamente limpio.

Goma laca en solución alcohólica.

Mezcla de doradores. — Debe aplicarse en caliente.

Parafina dura. — Colocar una tira a lo largo del cubreobjetos y calentar hasta que funda totalmente. La adherencia es mucho mejor si entre el porta y el cubreobjetos se toma la precaución de que el medio de montaje no llegue hasta los bordes. En este caso, la parafina puede llenar este espacio vacío de los bordes y aumentar la adherencia.

Mastic para acuarios. — Colocar en agua: yeso fino: 20 g + blanco de España: 2 g + litargirio: 20 g + resina en polvo 10 g; amasar con aceite de lino o con barniz plástico hasta que alcance la consistencia deseada.

Alambre para cementar

Uno mismo puede fácilmente diseñarse un utensilio adecuado para cementar los cubreobjetos. Basta coger un alambre de cobre de 1,5 mm de diámetro y clavarlo en un tapón.

Si no se dispone de betún puede cementarse en un medio acuoso siguiendo el método de R. Maire, colocado entre dos cubreobjetos de distinto tamaño que se depositan sobre una gran gota de resina, según queda descrito en la figura 119.

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

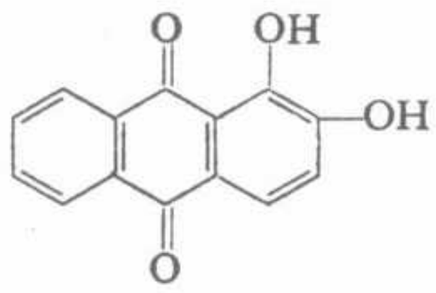
3/
COLORANTES

I. — PRINCIPALES COLORANTES

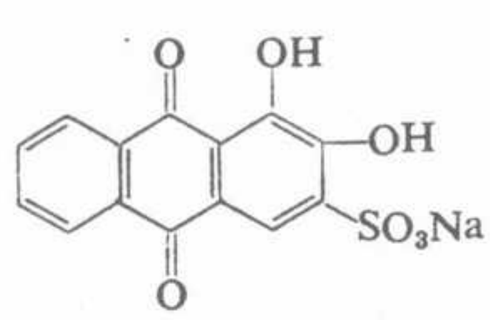
La relación que viene a continuación no es exhaustiva, es indicativa de los principales colorantes, sin especificidad histoquímica particular. En ella figuran los fluorocromos y los colorantes naturales. Los números que les preceden son los del *Color Index*, 2.ª ed. 1956-58 + suplemento 1963.

ANTRAQUINONAS

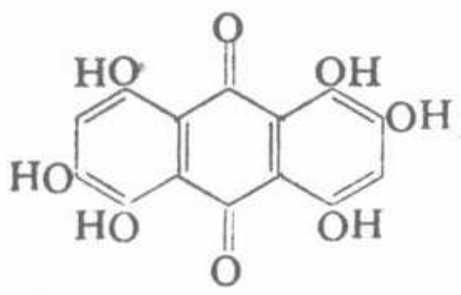
58 000. **Alizarina,** colorante ácido, su máxima absorción se presenta en solución alcalina: 566,5 mμm. Colorante vital para los tejidos nerviosos, indicador de pH. Hidrosolubilidad: 0, solubilidad en alcohol: 0,125.



58 005. **Rojo de alizarina**, ácido, absorción máxima de la solución alcohólica: 557 mμm. Solubilidad en agua del 7,6 %, solubilidad en etanol del 0,15 %. Tiñe la cromatina, tiñe vitalmente el tejido nervioso, el tejido óseo y los tejidos calcificados. Tiñe también los cromosomas. Indicador de pH.



58 605. **Azul de antraceno**, ácido, mordiente, forma una laca con el cromo, es poco soluble en agua, poco soluble en alcohol, puede usarse en sustitución de la hematoxilina.



62 555. **Veneno de alizarina**, ácido.

67 415. **Azul de antrazanina**, ácido, hidrosoluble, insoluble al etanol.

Azul BAZ, lisocromo.

61.555. **Azul liposoluble**, lisocromo.

58 205. **Purpurina**, ácido, forma una laca con el alumbre. Colorante nuclear. Tiñe específicamente el calcio.

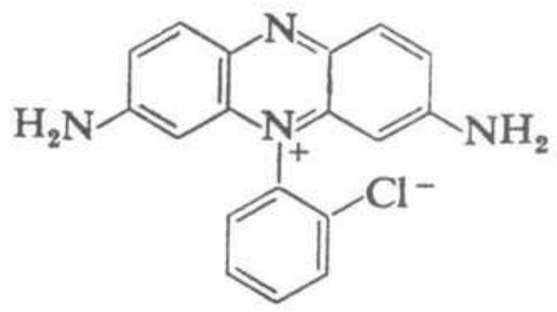
Rojo nuclear sólido, ácido.

AZINAS

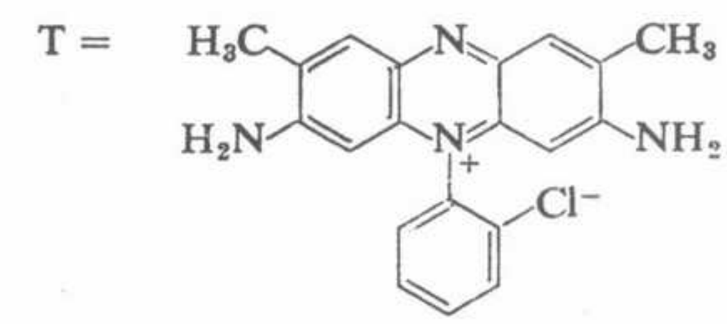
59 090. **Azocarmín azulado**, ácido, se emplea para preparar el método de Mollier y el azán de Heidenhain, muy soluble en agua.

50 085. **Azocarmín amarillento**, ácido, similar al anterior. Poco soluble en agua.

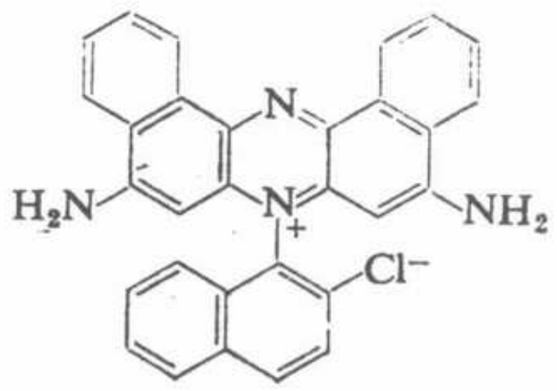
50 200. **Fenosafranina**, básica, colorante de las bacterias y de los hongos. Soluble en agua y en alcohol.



50 240. **Safranina O**, ácida, y **Safranina T**, básica, colorante nuclear muy importante, metacromático anaranjado.

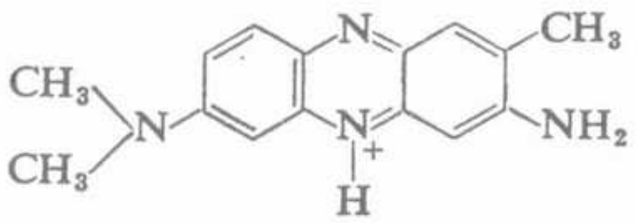


50 375. **Rojo magdala**, básico, poco soluble en agua, soluble en alcohol; colorante nuclear.



50 040. **Rojo neutro**, débilmente básico, indicador de pH, colorante vital no tóxico, es hidro-

soluble, pertenece al grupo de los colorantes neutros. Tiñe núcleo, vacuolas, Golgi y grumos de Nissl.

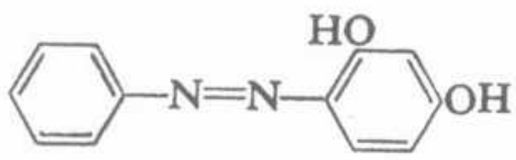


AZOICOS (MONO-)

18 050. **Rojo de amidonaftol**, ácido.

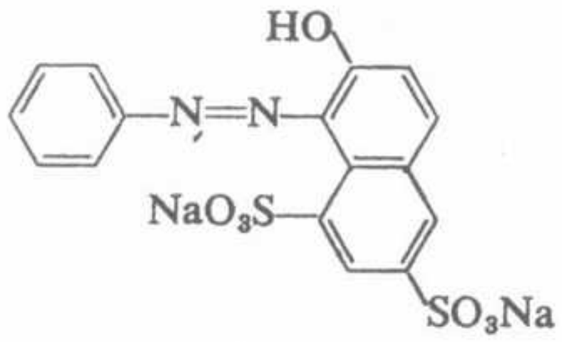
14 720. **Cromotropo FB**, ácido.

11 920. **Naranja Sudán amarillento**, ácido, poco soluble en agua, soluble en soluciones alcalinas, en acetona-etanol, disolvente de grasas, aceites, ceras. Tiñe muy bien los cuerpos grasos.



11 270. **Crisoidina**, básico, poco soluble en agua, soluble en alcohol etílico absoluto; absorción máxima 461, modif. a 100° colorante vital, tiñe el Golgi, secreciones, indicador de pH.

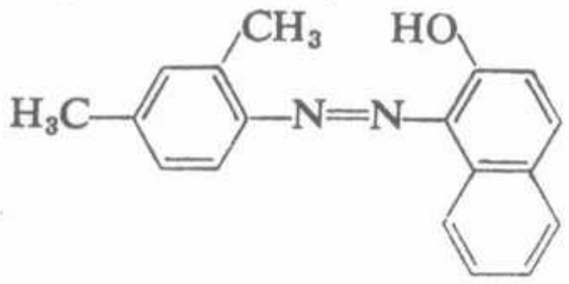
16 230. **Naranja G**, ácido, absorción máxima: 476-480, soluble en agua, poco soluble en etanol. Colorante plasmático, del tejido conjuntivo. Tiñe parásitos vegetales. Interviene en la técnica del Papanicolaou aplicada sobre células cancerosas. Forma parte del grupo de colorantes neutros.



16 180. **Rojo Bordeaux**, ácido, hidrosoluble, poco soluble en etanol; forma una laca crómica-alumínica, fluorocromo. Se utiliza en el método tricrómico de Masson.

16 575. **Cromotropo azulado**, ácido, hidrosoluble, insoluble en etanol.

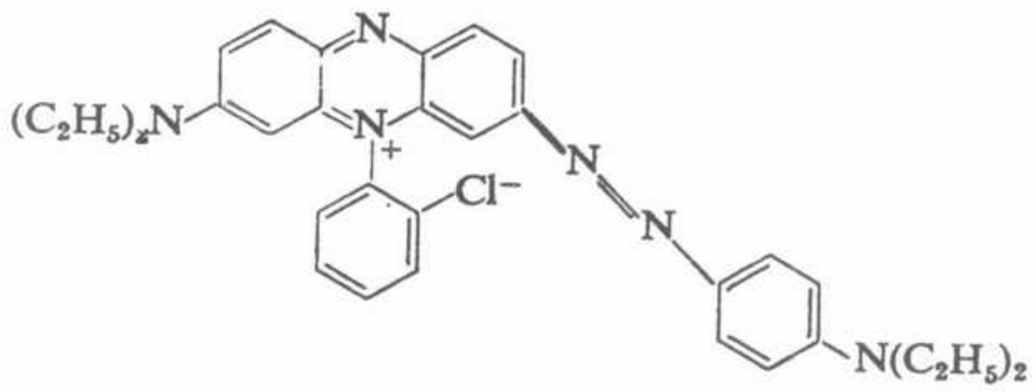
12 140. **Sudán II**, lisocromo, ácido, insoluble en agua, poco soluble en etanol, absorción máxima: 494,5-531,5. Se disuelve bien con el isopropanol, tiñe las grasas del tejido nervioso.



16 150. **Ponceau 2R**, ácido, hidrosoluble; insoluble en etanol, se utiliza como colorante de contraste en el método tricrómico de Masson.

12 020. **Pardo Sudán azulado**, lisocromo, colorante de las grasas.

11 050. **Verde Janus**, básico, soluble en agua y en etanol, muy tóxico, colorante vital de las mitocondrias, absorción máxima: 610-623.



13 065. **Amarillo de metanilo**, ácido, soluble en ClH; absorción máxima: 536, colorante plasmático y del tejido conjuntivo. Indicador de pH.

15 510. **Naranja II**, ácido, hidrosoluble, poco soluble en alcohol, absorción máxima: 483-487, indicador de pH, sustituye al Naranja G.

11 020. **Amarillo liposoluble**, lisocromo.

13 085. **Amarillo brillante sulfúrico**, ácido.

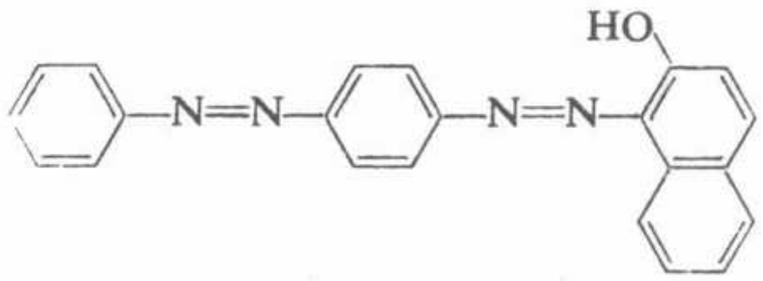
16 150. **Ponceau rojizo**, ácido.

14 895. **Azogrenadina sulfúrica**, ácido.

14 780. **Rojo tiazina rojizo**, ácido.

AZOICOS (POLI-)

26 100. **Sudán III**, lisocromo, ácido débil, insoluble en agua, poco soluble en etanol; absorción máxima alcohólica 508-510. Buen colorante de las grasas, de los tejidos cutinizados y suberificados.

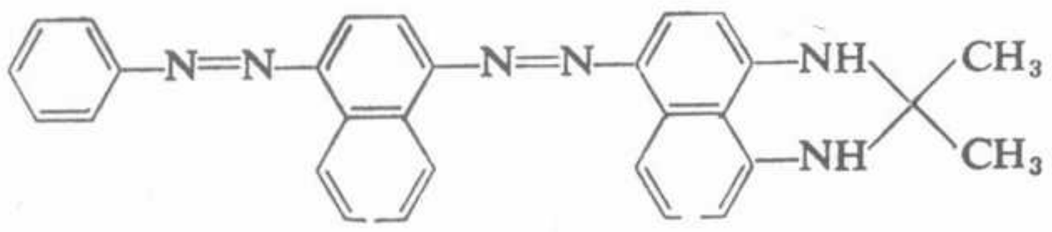


26 105. **Sudán IV**, lisocromo, débilmente ácido, insoluble en agua, poco soluble en etanol, absorción máxima de la solución etílica: 522-529. Es mucho mejor que el anterior, aunque tiene las mismas aplicaciones.

Acetil Sudán IV, es el anterior acetilado con el anhídrido acético en piridina; poco ácido, lisocromo, tiñe la mielina, lipofucsina, esteroides y lípidos en general.

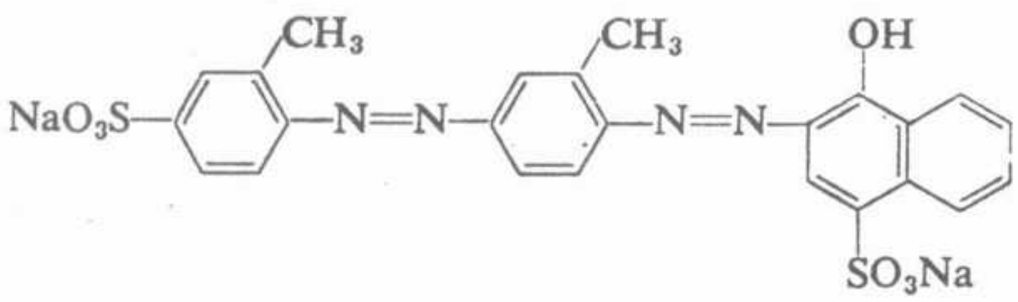
26 125. **Rojo liposoluble anaranjado**, lisocromo, aumenta la solubilidad de las mezclas de Sudán; insoluble en agua, poco soluble en etanol; soluble en parafinas, en acetato de etilo, aceites, ácidos grasos, esencia de trementina; muy soluble en acetona, benceno, toluol, isopropanol.

26 150. **Negro Sudán B**, lisocromo, absorción máxima: 596-605, tiñe los cuerpos grasos, de los cromosomas y de algunos gránulos.



27 195. **Ponceau azulado**, ácido, se utiliza en el método de Van Giesson.

26 670. **Orceína azulada**, ácida, absorción máxima: 523, tiñe las hifas de los hongos que forman las micorrizas, hongos parásitos, bacterias.

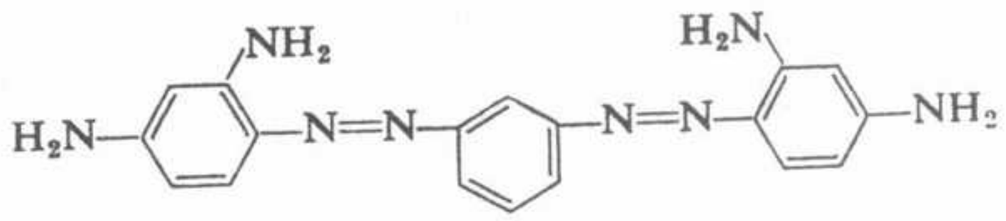


24 410. **Azul Chicago**, ácido, hidrosoluble, soluble en cellosolve, forma parte de tintas, tiñe el sistema vascular de las plantas en solución alcalina fuerte, tiñe los hongos parásitos de la piel o de las plantas.

24 020. **Azul diamina rojizo**, ácido.

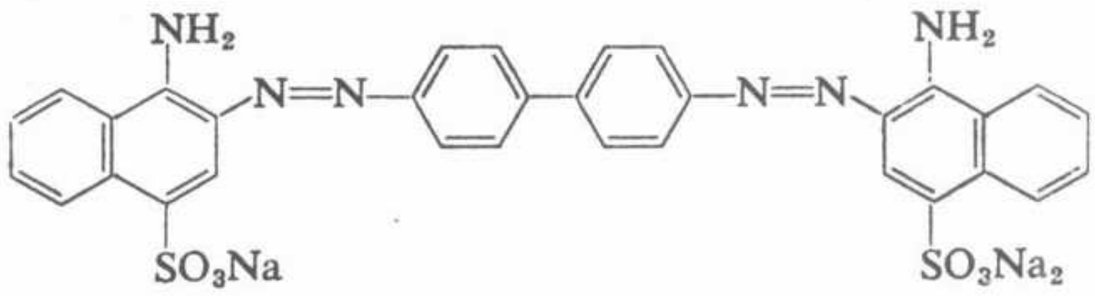
Azul Evans, ácido, colorante vital, análogo al azul tripán.

21 000. **Pardo Bismarck Y**, básico, hidrosoluble, soluble en alcohol, absorción máxima: 463, tiñe la mucina, la celulosa, las bacterias, las células cancerígenas (Papanicolaou). Colorante vital, se utiliza en solución fenólica.



21 010. **Pardo Bismarck rojizo**, básico, soluble en agua y en etanol, análogo al anterior.

22 120. **Rojo Congo**, ácido, soluble en agua y en etanol. Absorción máxima: 497, tiñe muy bien los axones, las paredes quitinosas de los hongos, especialmente de los urodinales, las mucinas, la celulosa, los protozoos, las levaduras, el amiloide. Indicador del pH.

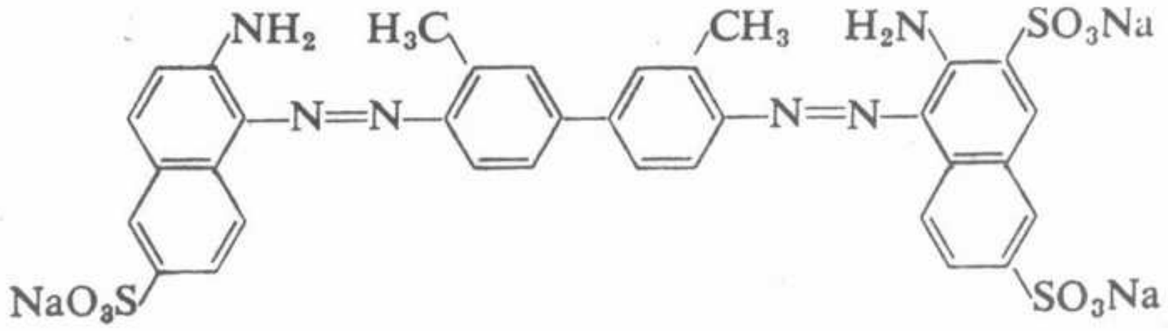


22 850. **Rojo tripán**, ácido, colorante vital.

23 500. **Benzopurpurina**, ácido, soluble en etanol. Absorción máxima: 497, colorante plasmático.

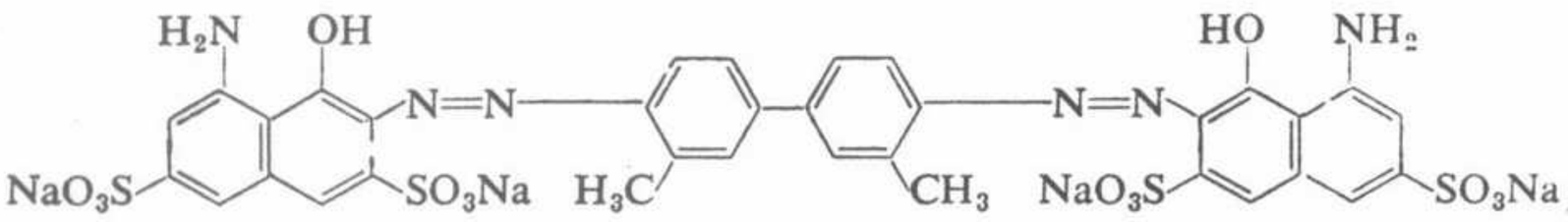
23 510. **Púrpura brillante R,** ácido colorante vital de las levaduras, tiñe el tejido conjuntivo y el amiloide.

23 570. **Rojo vital**, ácido, absorción máxima: 498; es un excelente colorante vital.



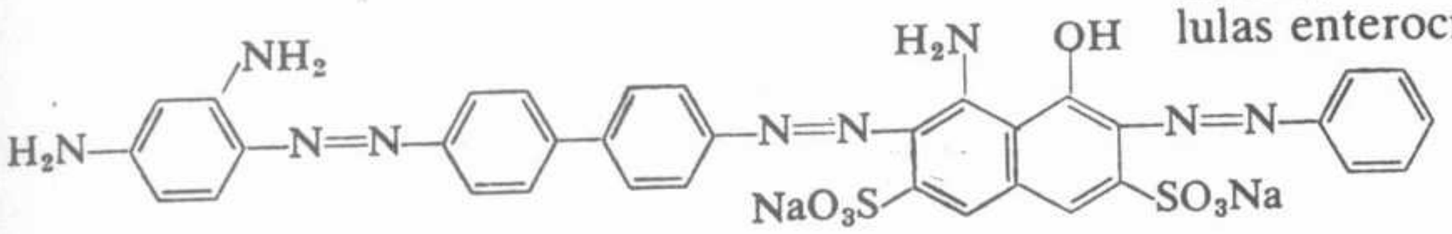
23 680. **Azul Azo**, ácido, absorción máxima: 560,5, colorante vital de protozoos, colorante negativo de las cápsulas bacterianas.

23 850. **Azul tripán**, ácido, colorante vital, se fija sobre el sistema reticuloendotelial, los tubos uriníferos, las clamidosporas de los hongos, el amiloide.



28 160. **Rojo Sirius muy azul**, ácido, hidrosoluble, soluble en cellosolve, poco soluble en etanol, insoluble en otros disolventes orgánicos, tiñe el retículo y la colágena, el núcleo, los mucopolisacáridos.

30 235. **Negro clorazol,** ácido, absorción máxima: 598-602 en solución etanólica, colorante nuclear y citoplasmático. Se utiliza tanto en histología animal como vegetal. Específico de la quitina, por ello recomendado para teñir la cutícula de los insectos y otros artrópodos, a la vez que las hifas de los hongos.



35 780. **Rojo Sirius azulado,** análogo al Rojo Sirius 4B.

Azul negro B, ácido.

20 470. **Azul de negro naftol**, ácido.

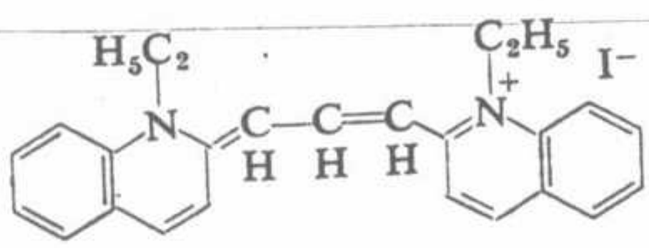
26 905. **Escarlata de Biebrich**, ácido.

26 125. **Rojo al aceite O**, lipocromo.

CIANINAS, QUINOLEÍNAS

Azul de quinoleína, soluble en agua y en etanol.

Pinacianol, básico, fotosensible, ideal para teñir cortes obtenidos por congelación, colorante posvital, fluorocromo.



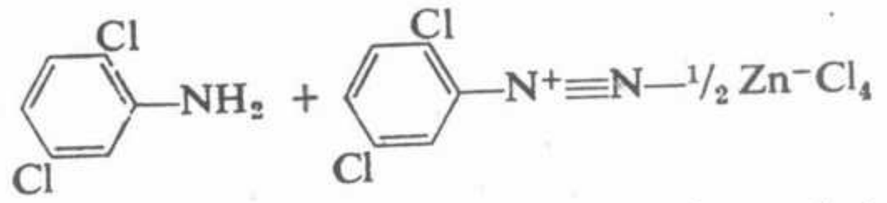
DIAZONIO, TETRAZONIO, TETRAZOLIO

Son incoloros, adquieren propiedades tintoriales cuando se asocian con fenoles, con arilaminas, con naftol, con naftilaminas, presentes en las células. Es preferible prepararlos justo antes de usar, a continuación detallaremos dos fórmulas de partida, que al mezclarlas dan el colorante que tiene propiedades tintoriales durante un cierto tiempo.

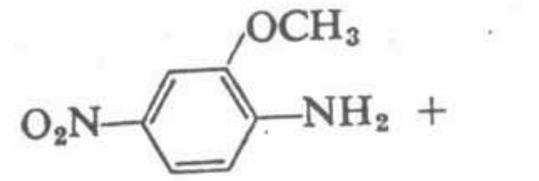
37 020. **Pardo intenso amarillento**, rápido.

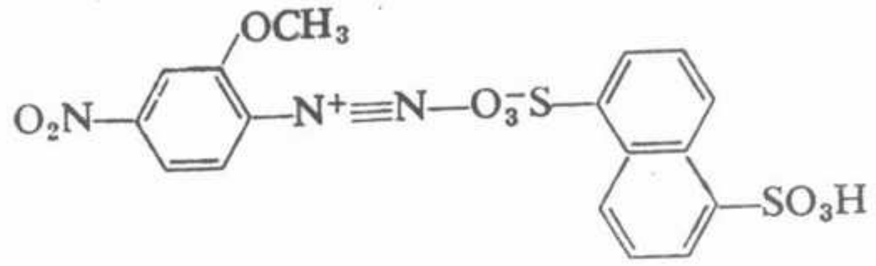
37 035. **Rojo intenso amarillento**, tiñe rápidamente, muy adecuado para poner de manifiesto las células enterocromafines.

37 010. **Escarlata intenso amarillento**, soluble en agua, tiñe muy rápidamente, es muy estable.

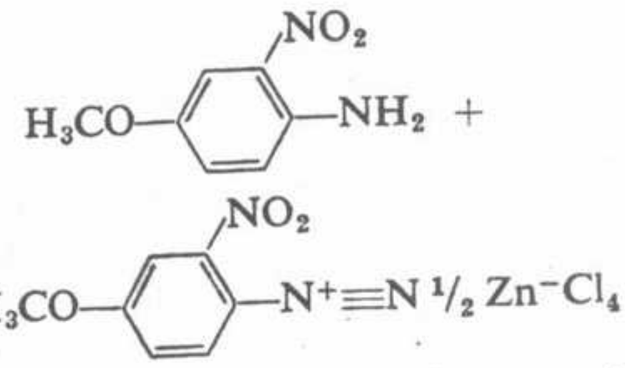


37 125. **Rojo intenso azulado**, tiñe rápidamente, es muy estable, tiñe selectivamente las células enterocromafines.



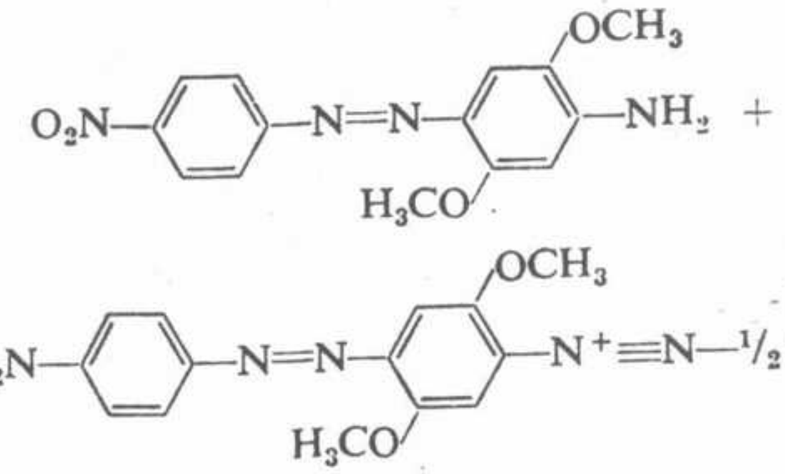


37 135. **Bordeaux intenso**, rápido y estable, tiñe las células enterocromafines.

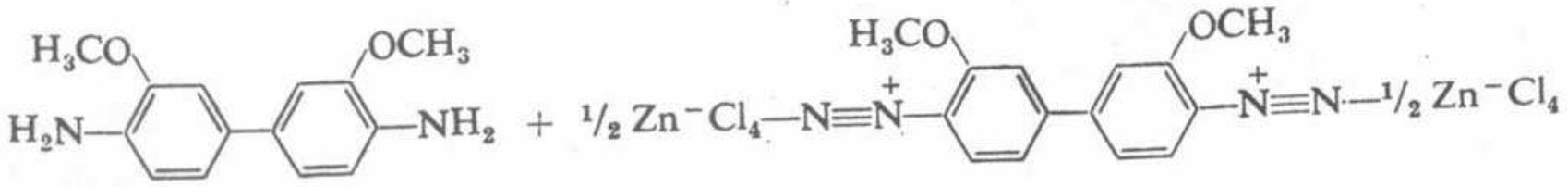


37 165. **Violeta intenso azulado**, reacción muy lenta, estable, tiñe específicamente las células enterocromafines.

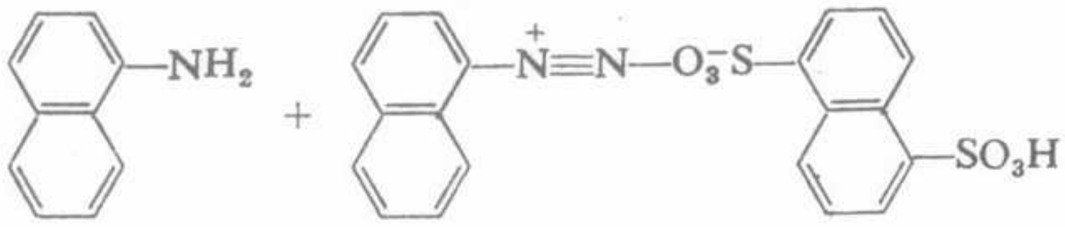
37 190. **Negro intenso** K, lento, poco estable, sin embargo ofrece óptimas tinciones de proteínas y de células enterocromafines.



37 235. **Azul intenso azulado**, actúa muy lentamente, es estable, excelente colorante de naftoles y de las células enterocromafines.

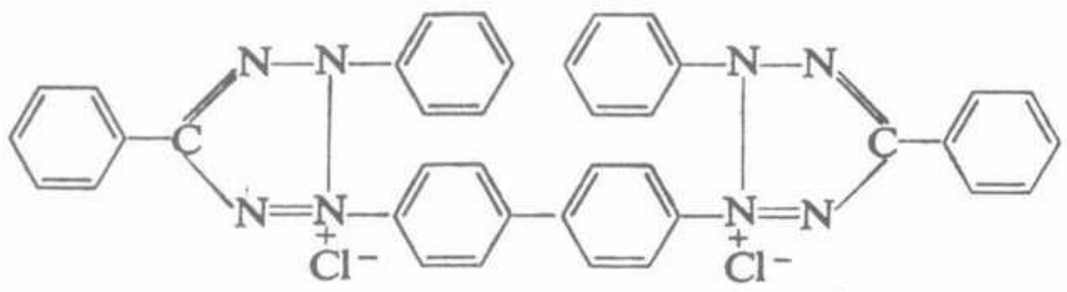


37 265. **Alfa-naftilamina**, lento, inestable, buen colorante.

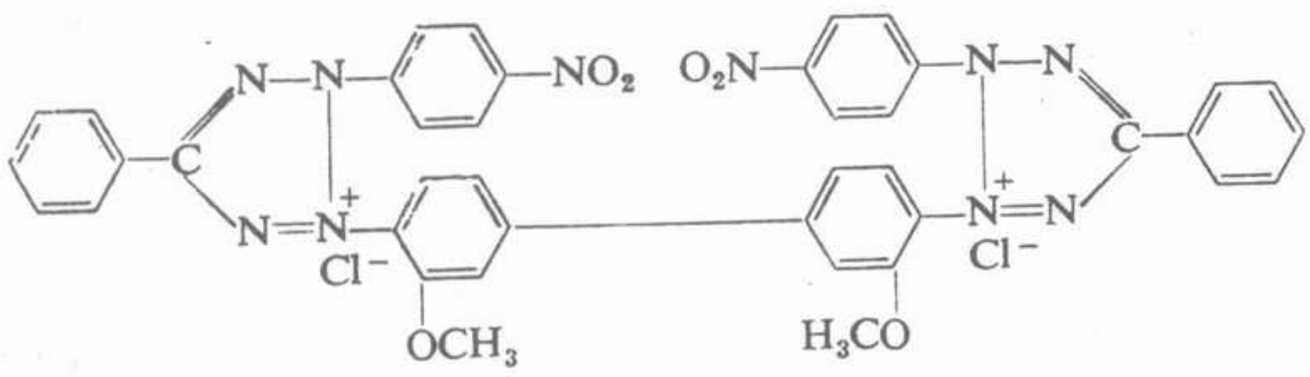


37 275. **Rojo intenso AL**, lento, poco estable.

Neotetrazolium, excelente para la diferenciación histológica.

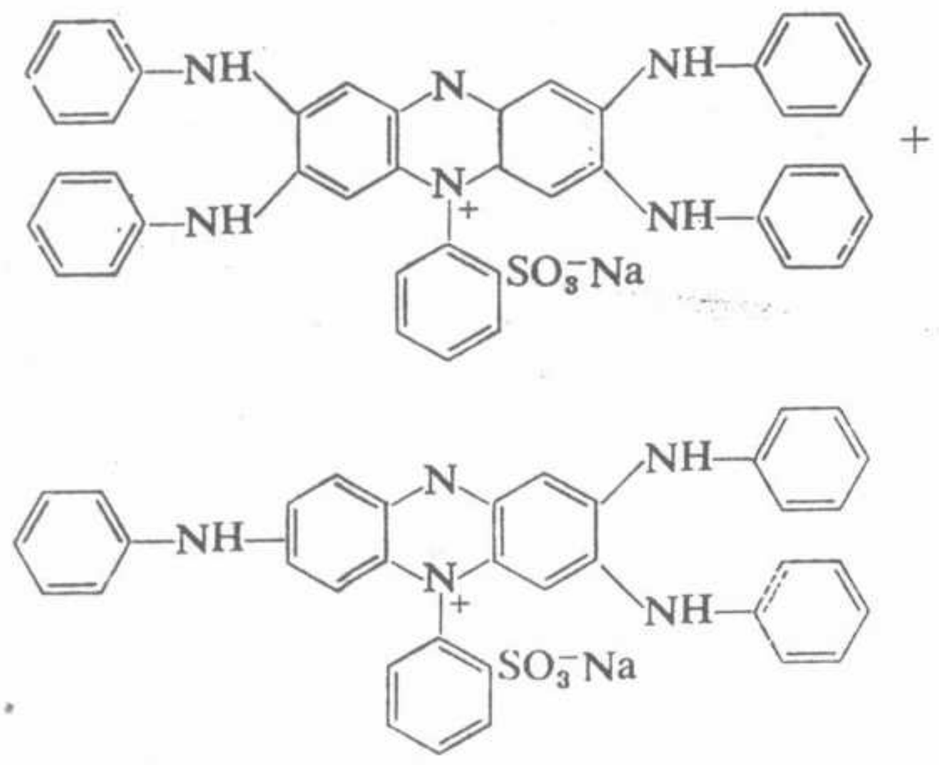


Azul nitrogenado de tetrazolium, es el mejor y por consiguiente el más utilizado, permite una adecuada deshidratación.



INDOLINAS

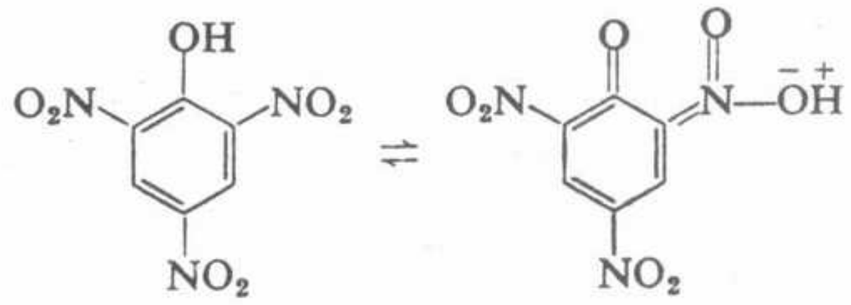
50 405. **Indolina hidrosoluble,** ácido, tiñe en bloque, ofrece resultados variables.



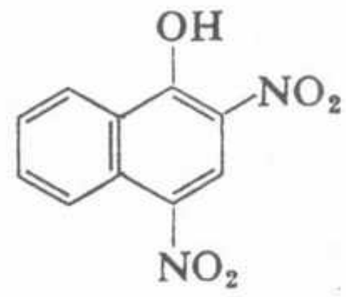
50 420. **Nigrosina sulfonada**, ácido, hidrosoluble, ofrece tinciones negativas y es especialmente recomendado para ciertas estructuras: tejido nervioso, páncreas. Tiñe negativamente la cromatina, así como algas, hongos y cápsulas bacterianas.

NITROCOLORANTES (colorantes nitrogenados)

10 305. **Ácido pícrico** (trinitrofenol), ácido, hidrosoluble, soluble en etanol; absorción máxima: 360 en alcohol, muy utilizado no sólo como integrante de múltiples fijadores, sino también como colorante de las fibras de colágena, de los músculos, de las proteínas básicas del citoplasma, de las paredes celulares de las algas; es ligeramente descalcificante.

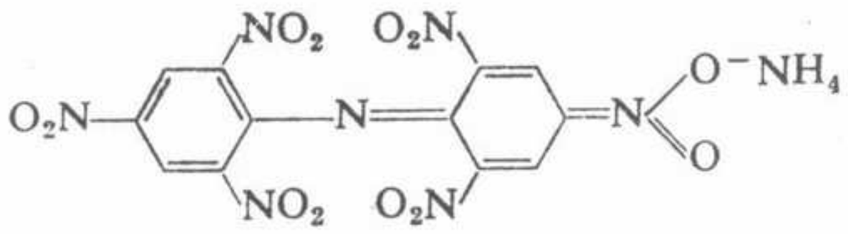


10 315. **Amarillo de Mars**, ácido, es una sal de Na; hidrosoluble, poco soluble en etanol, cuando actúa como una sal de Ca presenta las propiedades invertidas. Tiñe células malignas o infectadas por hongos, es adecuado para poner de manifiesto los tubos polínicos, indicador de pH, puede utilizarse como un filtro líquido.



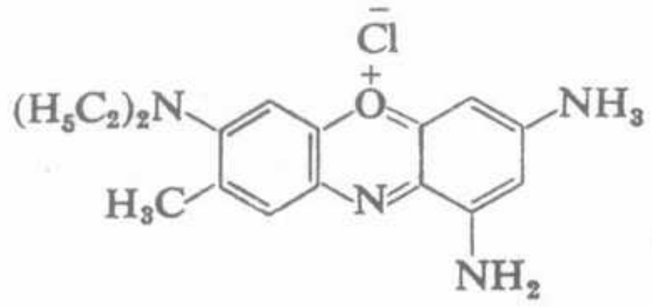
10 316. **Amarillo naftol sulfonado**, ácido, hidrosoluble, insoluble en etanol, tiñe selectivamente la colágena, así como las proteínas básicas.

10 360. **Aurantia**, ácido, insoluble en agua, soluble en etanol. Desensibilizador fotográfico, tiñe los virus, induce la poliploidia en las plantas.



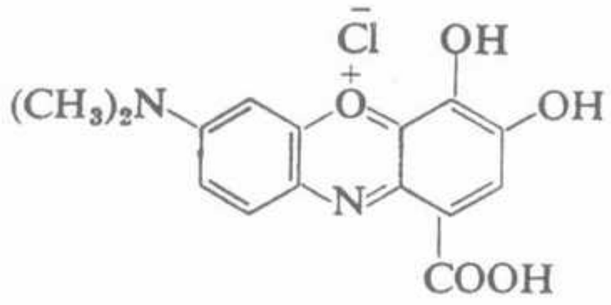
OXACINAS

51 010. **Azul de crésil brillante**, básico, hidrosoluble. Absorción máxima: 624-628, indicador de procesos de oxidorreducción, colorante vital, indicado para la tinción de protozoos, nemátodos. Es citoplasmático, tiñe muy bien las plaquetas, las células tumorales, estructuras metacromáticas de los hongos; hay tres fórmulas posibles, una de las más frecuentes es:



51 400. **Lacmoide**, indicador de pH.

51 030. **Gallocianina**, básico, absorción máxima: 636, colorante nuclear cuando se forma una laca férrica.



51 045. **Azul de gallamina**, básico, absorción máxima: 651, iguales propiedades que el anterior.

51 180. **Azul de Nilo A**, básico, absorción máxima: 635-645; tiñe la lipofucsina, el hueso, supravitalmente colorea los protozoos, embriones, larvas, es indicador de pH.

Violeta de Cresil (= Cresil violeta), básico, metacromático, tiñe los tejidos nervioso y conjuntivo.

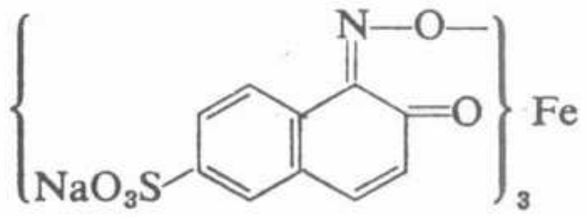
51 175. **Nuevo azul rojizo**, básico, absorción máxima: 573, tiñe las inclusiones lipídicas.

PIRAZOLONAS

Amarillo sólido, ácido.

QUINONAOXIMAS (NITROSO-)

10 020. **Verde naftol azulado**, actúa previa aplicación de un mordiente de tipo férrico o crómico, es ácido.



FITALOCIANINAS

74 240. **Azul alcian**, básico, tiñe las mucinas.

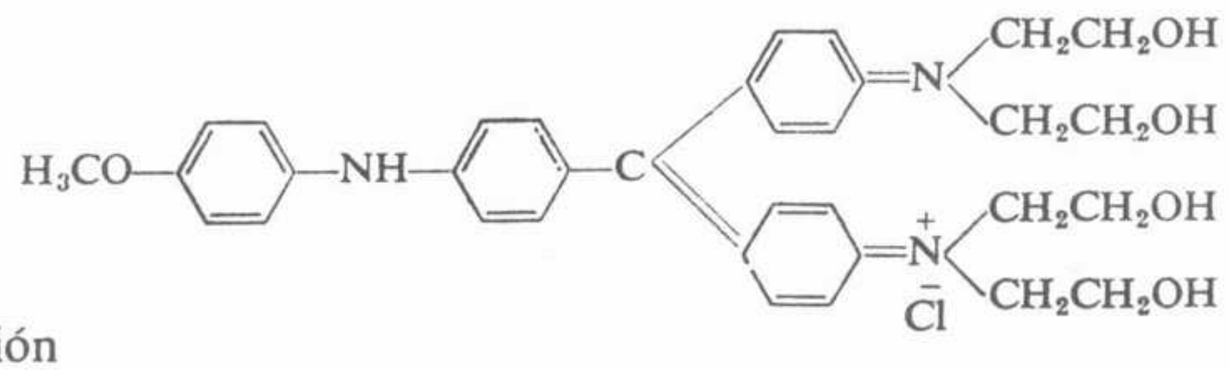
Azul astra, básico, análogo al precedente.

Azul luxol, básico.

Amarillo alcian, básico, colorante de la mucosa gástrica.

Verde alcian, básico, tiene las mismas propiedades que el anterior.

42 705. **Astracianina B**, básico y lisocromo, insoluble en agua, soluble en etanol, tiñe específicamente la mielina.

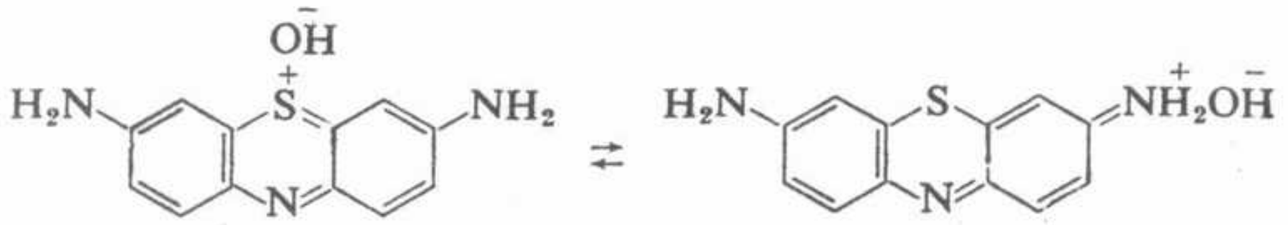


Verde naftol B, ácido, debe efectuarse un mordantaje con hierro, cromo o cobalto.

TIACINAS

52 000. **Tionina**, básica, poco soluble en agua y en etanol.

Es un colorante metacromático, tiñe específicamente la mucina, la ligonina, el amiloide, diversos tejidos de insectos, actúa como colorante vital. Asimismo tiñe hueso, hongos parásitos y cortes obtenidos por congelación.

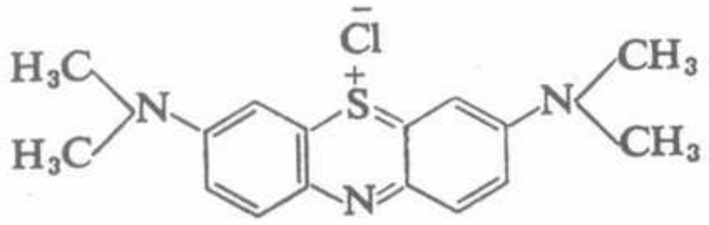


52 010. **Azur de metileno**, básico, colorante de la sangre, de los corpúsculos de Negri, tiñe metacromáticamente el ácido ribonucleico.

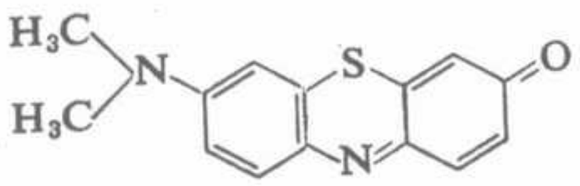
Dimetil tionina, básico, colorante nuclear, tiñe las bacterias acidorresistentes, cartílago, mastocitos. Actúa metacromáticamente sobre las sulfo y sialomucinas.

Monometil tionina, básico como el anterior.

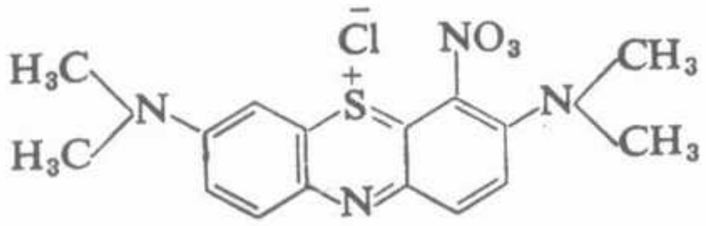
52 015. **Azul de metileno**, básico, soluble en agua y en etanol. Absorción máxima: 664-666. Muy difícil de obtener en estado puro. Colorante nuclear, bacteriano, vital del tejido nervioso. Adecuado para teñir protozoos. Forma parte de las soluciones tintoriales empleadas para teñir extensiones de sangre. Tiñe los cuerpos de Negri, virus, tejido conjuntivo, médula ósea, rickettsias. No es tóxico.



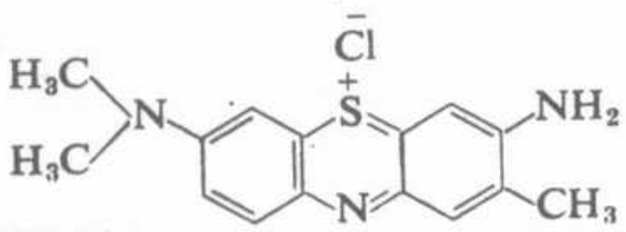
50 205. **Violeta de metileno**, básico, absorción máxima: 580; es insoluble en agua, salvo si se encuentra mezclado con el azul de metileno o con algún azur. Tiñe núcleos y granulaciones citoplasmáticas de linfocitos.



52 020. **Verde de metileno,** básico, soluble en agua, poco soluble en etanol. Absorción máxima: 607,660, tiñe el leño, la cromatina, colorante vital en los insectos, metacromasia en los mastocitos.

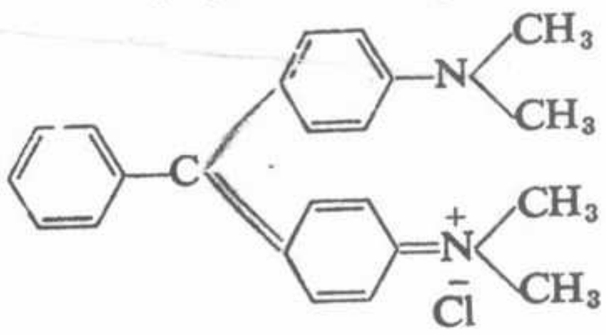


52 040. **Azul de toluidina**, básico, soluble en agua y en alcohol, colorante nuclear de los cuerpos de Nissl, de los cuerpos cromófilos, de bacterias. Tiñe metacromáticamente las células cebadas, la condrina del tejido cartilaginoso y las mucinas.

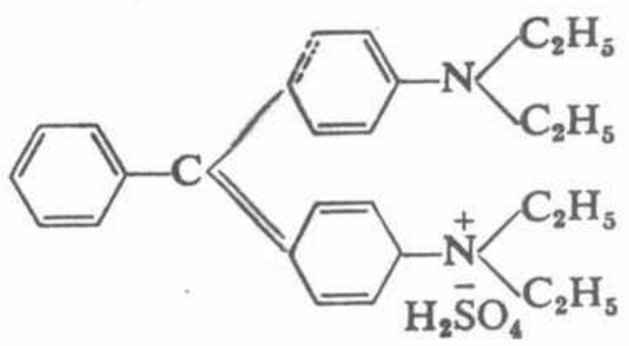


TRIARILMETANOS

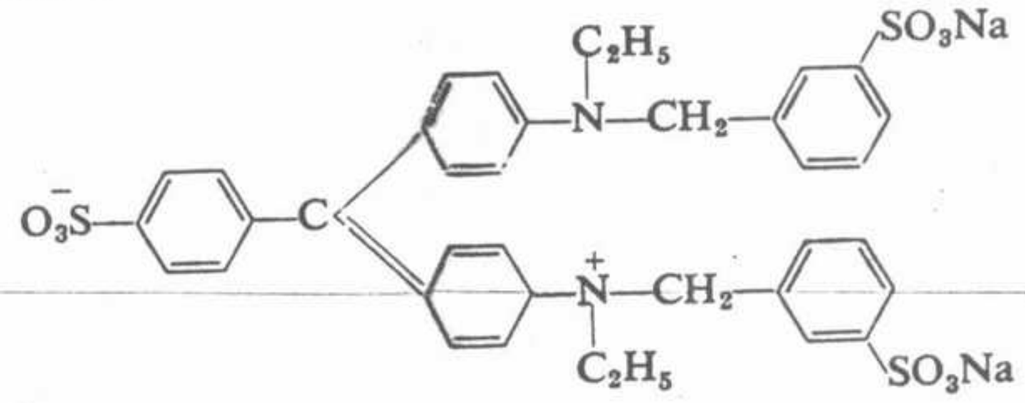
42 000. **Verde malaquita**, básico, indicador de pH, absorción máxima: 618. Tiñe eritrocitos, huevos de lombrices intestinales, fitoparásitos, bacterias, esporas bacterianas. Tiñe vitalmente el núcleo de células vegetales.



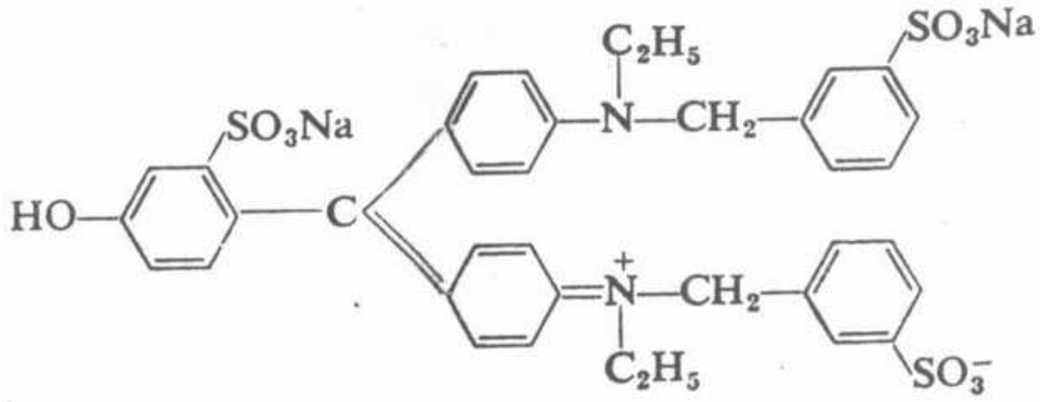
42 040. **Verde brillante**, básico, absorción máxima: 630, colorante de las bacterias, espiroquetas, hongos microscópicos y levaduras.



42 095. **Verde luz,** ácido, muy soluble en agua, soluble en etanol, absorción máxima: 629-634, colorante citoplasmático, tiñe muy bien las bacterias, las levaduras, las algas, las fibras de colágena, la celulosa, los tubos polínicos. Se destiñe rápidamente. No se trata de una tinción permanente.

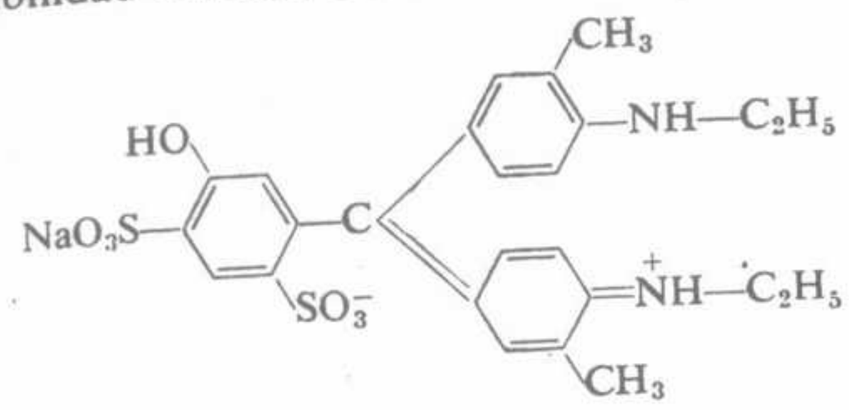


42 053. **Verde intenso**, FCF, ácido, colorante de tejidos vegetales, de bacterias. Tiñe específicamente las fibras de colágena y de forma más duradera que el verde luz. Hidrosoluble, poco soluble en etanol.



42 045. **Azul sólido**, ácido, muy soluble en agua, soluble en alcohol, indicador de pH, colorante de la hemoglobina, de las espiroquetas, colorante vital.

43 535. **Cianol**, básico, soluble en agua, muy soluble en etanol, se utiliza para estudiar la permeabilidad celular, es indicador de pH.



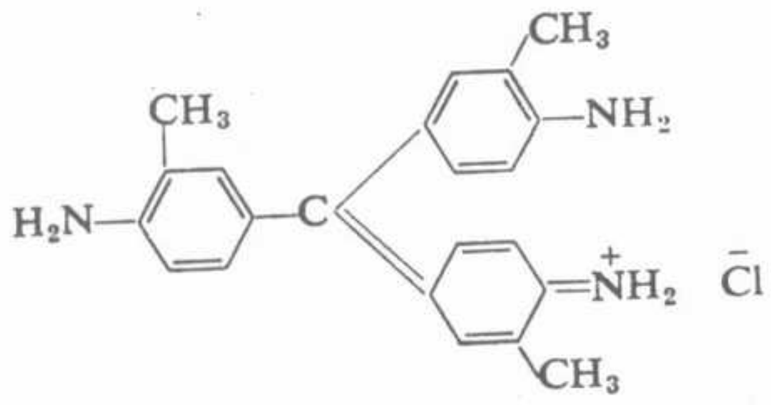
42 500. **Pararrosanilina**, básico, poco soluble en agua, soluble en etanol, absorción máxima: 545.

42 510. **Rosanilina**, básico, poco soluble en agua, soluble en etanol, absorción máxima: 550.

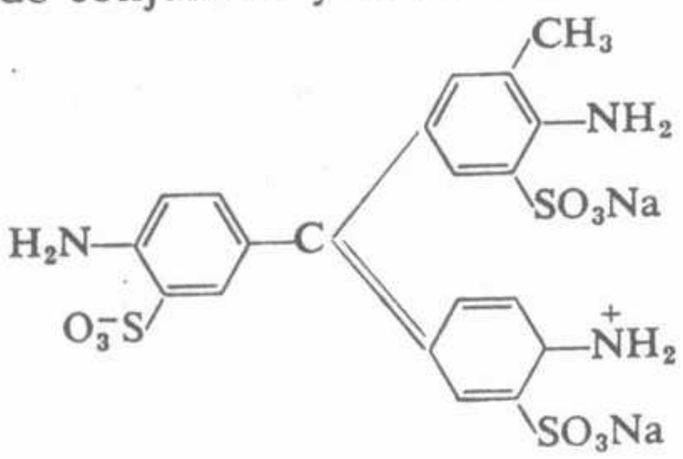
Dimetil fucsina, básico, absorción máxima: 554.

Fucsina básica, mezcla de los tres anteriores, de peor calidad que el siguiente colorante.

42 520. **Neofucsina**, básica, hidrosoluble, soluble en etanol, absorción máxima: 556, colorante nuclear, de la mucina, de las fibras elásticas del tejido conjuntivo, tiñe algunos de los componentes de la pared bacteriana, de los lípidos plasmógenos, del glucógeno, de los tubos polínicos, de diversos orgánulos de la célula vegetal, flagelos, cápsulas bacterianas, cuerpos de Negri.



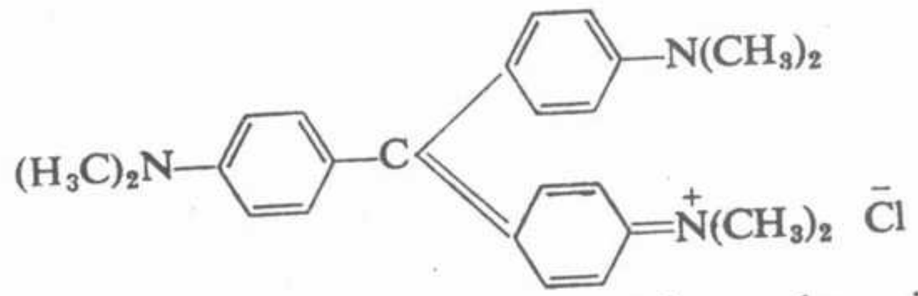
42 685. **Rosanilina ácida trisulfonada**, ácida, absorción máxima: 543, indicador de pH, colorante citoplasmático. Muy utilizado en tinción tisulares de tumores, para detectar infecciones de tejidos vegetales, de la celulosa. Tiñe mitocondrias, tejido conjuntivo y micorrizas.



42 530. **Violeta de Hofmann**, básico, tiñe las células plasmáticas metacromáticamente, así como el amiloide.

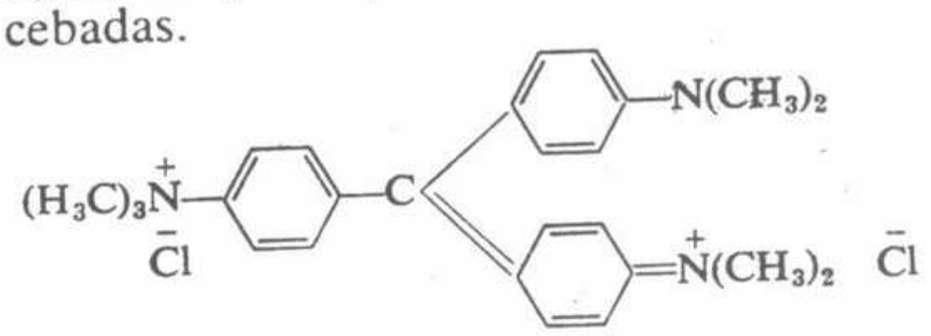
42 535. **Violeta de metilo**, básico, hidrosoluble, muy soluble en etanol, absorción máxima: 585, mezcla de tetra-pentahexametil pararrosanilina, indicador de pH, colorante histológico y bacteriológico.

42 555. **Cristal violeta**, básico, hidrosoluble, muy soluble en etanol. Absorción máxima: 590, tiñe vitalmente el amiloide, colorante de los tejidos lignificados, de los tubos polínicos, esporocistos, bacterias en cultivo y tisulares.



42 600 **Violeta de etilo**, básico, absorción máxima: 596, indicador de pH, tiñe las espiroquetas y el tejido nervioso.

42 585. **Verde de metilo**, básico, absorción máxima: 632, colorante nuclear del tejido lignificado, tiñe muy bien protozoos, gonococos y células cebadas.



42 590. **Verde de etilo**, básico, muy similar al anterior, posee las mismas aplicaciones.

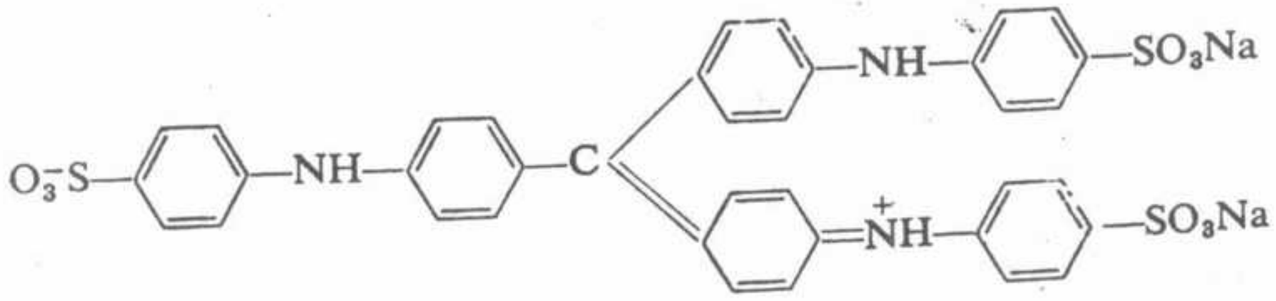
42 556. **Verde yodo**, básico, próximo a los dos anteriores. Tiñe el núcleo. Da muy buenos resultados aplicándolo sobre el tejido nervioso y sobre los tejidos lignificados. Colorea las bacterias y metacromáticamente, las mucinas y el amiloide.

42 576. **Violeta de formilo**, ácido.

42 775. **Azul Lyon**, básico, insoluble en agua, soluble en etanol, absorción máxima: 581; colorante de contraste.

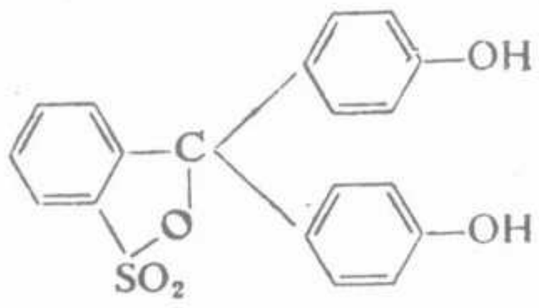
42 755. **Azul de anilina**, ácido, colorante citoplasmático, tiñe específicamente la colágena. Se utiliza tanto en histología animal como en histología vegetal.

42 780. **Azul de metilo**, ácido, absorción máxima: 607, colorante de contraste. Tiñe bacterias,



cubiertas de algunas esporas e hifas fúngicas. Tiñe vitalmente los protozoos.

Fenolsulfoneftaleína, indicador de pH. Generalmente se utiliza para teñir el riñón.



42 563. **Azul Victoria muy rojo**, básico, soluble en agua, muy soluble en etanol. Absorción máxima: 593. Tiñe virus, flagelos, protozoos parásitos, neurosecreciones.

44 040. **Azul Victoria rojizo**, básico, soluble en agua y en etanol. Tiñe espermatozoides y espiroquetas.

44 045. **Azul Victoria azulado**, básico, absorción máxima: 619, tiñe la neuroglia, las fibras elásticas y las bacterias.

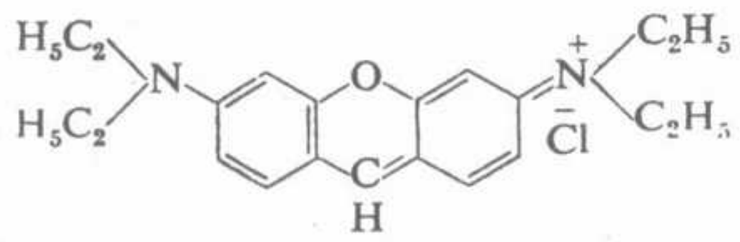
44 085. **Azul noche**, básico, tiñe las bacterias acidorresistentes.

44 630. **Verde naftocromo**, debe usarse previamente un mordiente.

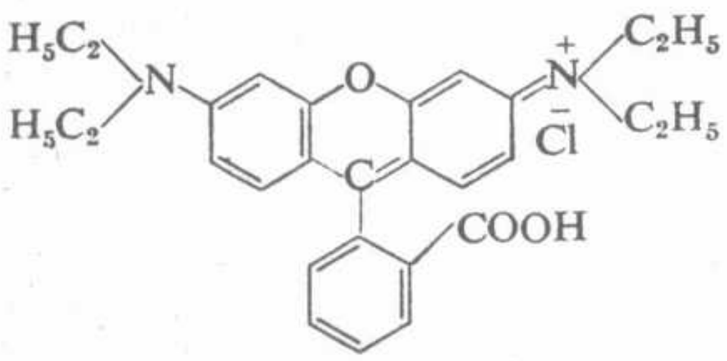
XANTENOS

45 005. **Pironina amarillenta,** básica, soluble en agua y en etano. Absorción máxima: 552. Eminentemente citoplasmática.

45 010. **Pironina azulada**, básica, absorción máxima: 555. Colorante eminentemente citoplasmático.

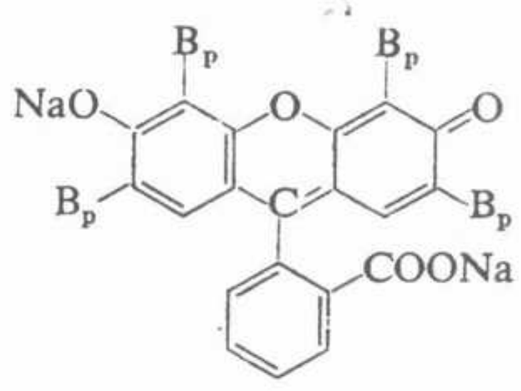


45 170. **Rodamina azulada**, básica, poco soluble en agua, soluble en etanol. Absorción máxima: 556,5. Se utiliza para teñir extensiones de sangre. Vitalmente se utiliza para células vegetales. Es un fluorocromo. Tiñe el complejo de Golgi.



45 190. **Violeta ácido intenso rojizo**, ácido, colorea las fibras de colágena.

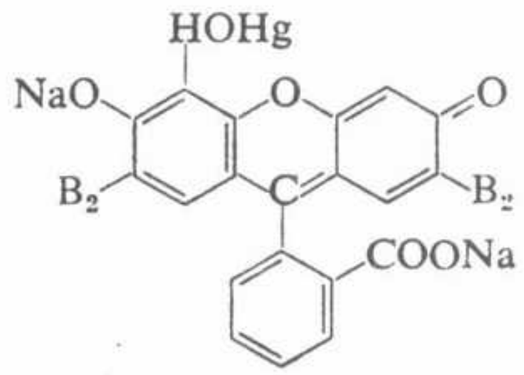
45 380. **Eosina,** tetrabromofluoresceína, ácido, soluble en agua, soluble en etanol, indicador fluorescente. Se utiliza para teñir extensiones de sangre, para el tejido nervioso, la médula ósea, bacterias tisulares.



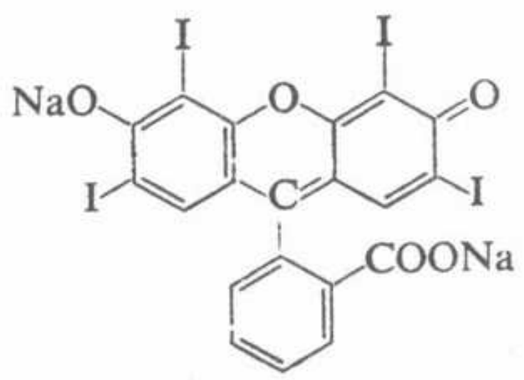
45 386. **Etil-eosina**, ácida, poco soluble en agua, soluble en etanol, se utiliza como colorante de contraste, para poner de manifiesto los cuerpos de Negri y para teñir el tejido nervioso.

45 400. **Eosina azulada**, ácida, muy soluble en agua, soluble en etanol.

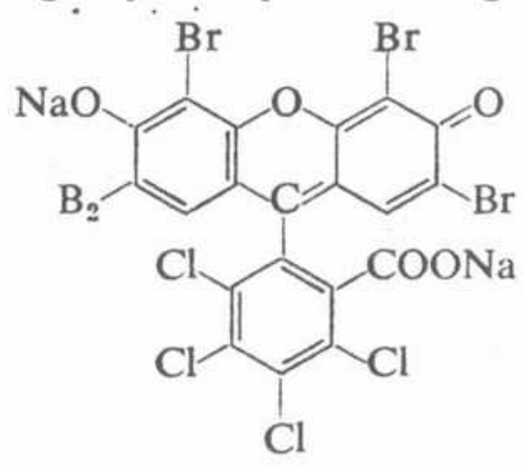
Mercurocromo 220, colorante de fondo, va muy bien para poner de manifiesto esporas bacterianas.



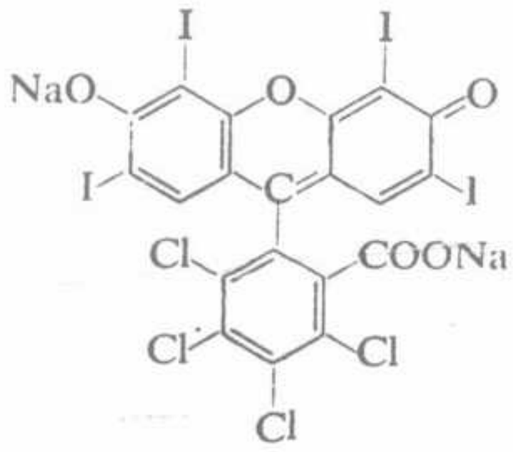
45 430. **Eritrosina azulada**, indicador fluorescente, colorante citoplasmático. Se aplica sobre bacterias del suelo, es un colorante vital. Muy hidrosoluble, también se disuelve en etanol. Absorción máxima: 524-527.



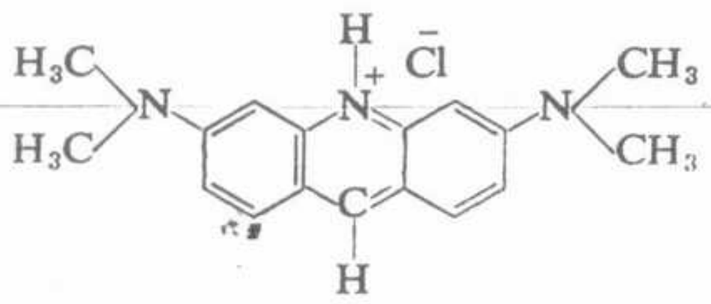
45 410. **Floxina azulada**, muy soluble en agua, soluble en etanol; absorción máxima: 547, tiñe algas, hongos y cuerpos de Negri.



45 435. **Rosa de Bengala amarillenta**, ácida, muy soluble en agua y en etanol. Absorción máxima: 544-548. Tiñe las bacterias del suelo, de tejidos, del hígado.



46 005. **Naranja de acridina**, básico, absorción máxima: 497, colorante vital aplicado generalmente sobre tumores, fluorocromo del núcleo; también se obtiene esta respuesta con las células cebadas.



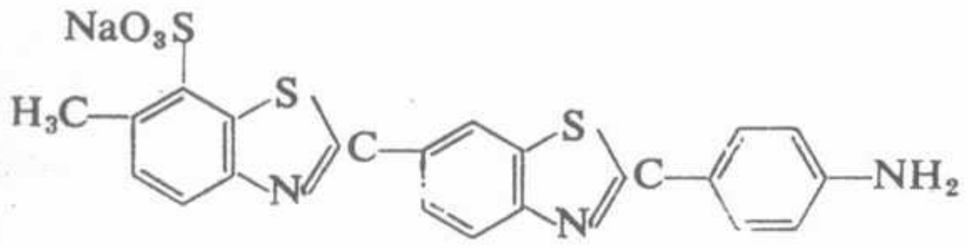
Atebrina, fluorocromo, se aplica para reconocer los parásitos de la sangre, de los tejidos de los insectos.

46 045. **Fosfina**, fluorocromo de los nucleoides bacterianos, se utiliza también para teñir los tejidos de insectos.

Seudoisocianina, metacromático, fluorocromo bastante utilizado.

TIAZOLES

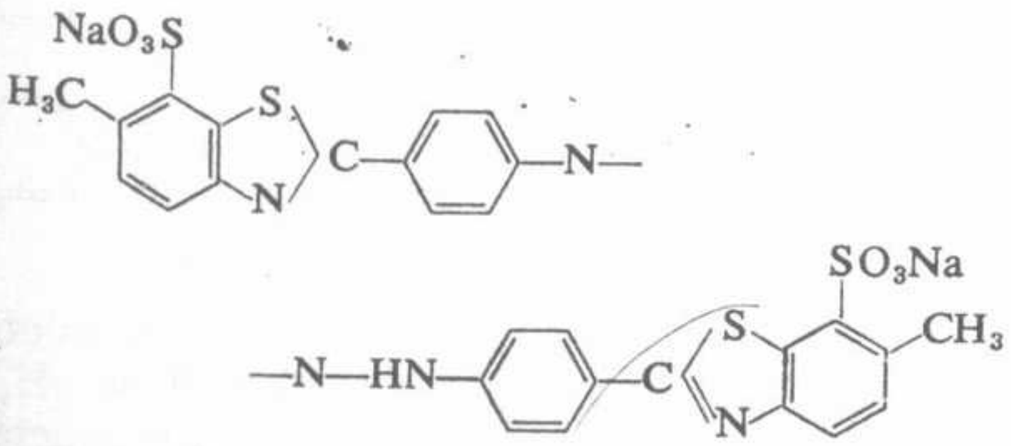
49 000. **Primulina**, ácido, colorante vital fluorescente.



49 005. **Tioflavina**, básico, fluorocromo, aplicado para estudios histológicos de insectos.

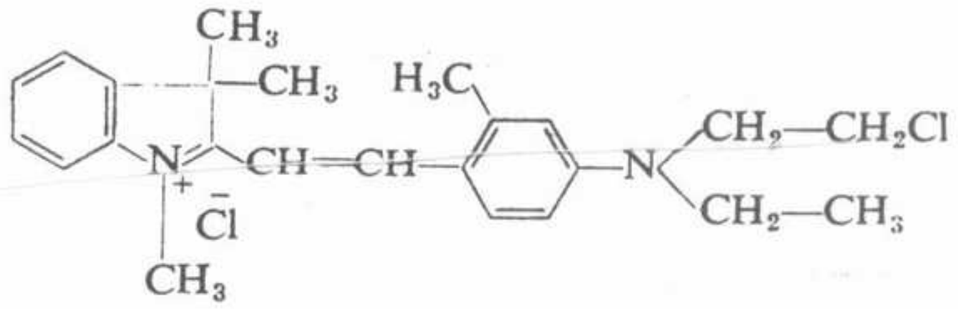
49 010. **Metil primulina**, ácido, colorante vital fluorescente.

19 540. **Amarillo de tiazol**, ácido, indicador de pH, fluorocromo, colorante vital fluorescente.



POLIMETINAS

48 020. **Rojo astrazon** FG, básico, colorante de la celulosa y de los tejidos lignificados.



COLORANTES DE TIPO MINERAL

Azul de Prusia, ferrocianuro férrico, puede aplicarse por perfusión, pone de manifiesto el hierro.

Azul de Turnbull, ferrocianuro férrico. Para evidenciar el hierro.

Negro carbón, fina suspensión coloidal de carbón, se trata de la tinta china. Por perfusión o por inyección intravenosa se introduce en un organismo. Las partículas son fagocitadas e incorporadas en las células del sistema reticuloendotelial. Coloración negativa.

Azul cielo, cobalto estanato sulfato cálcico. Tiñe por inyección.

Amarillo de cromo, cromato de plomo, se inyecta.

Bermellón, sulfuro de mercurio, cinabrio, se inyecta.

Rojo de rutenio, oxicloruro de rutenio amoniacado. Tiñe las pectinas.

Verde esmeralda, óxido de cromo hidratado. Debe inyectarse.

Plata coloidal, colorante neurológico y de proteínas.

Oro coloidal, igual que en el caso anterior.

Yodo, en solución acuosa yodo-yodurada o Lugol, tiñe específicamente el almidón.

Cobalto, se aplica bajo forma de cobaltoestanato, colorante metacromático higroscópico y colorante cianhídrico.

Antimonio, se aplica bajo forma de bisulfuro de antimonio, colorante dicroico intermicelar en luz polarizada.

Molibdeno, bajo forma de «Azul de molibdeno»: sesquióxido de molibdeno.

Estaño, bajo forma de clorostanato de etilo.

Talio, bajo forma de reactivo de Henry: óxido de talio: 2 g + ClH: 80 gotas + NO_3H: 80 gotas + CO_3NaH: 1 g + agua: 100 ml.

Selenio: bajo forma de cloruro.

77 007. **Azul ultramar**, silicatoalumínico de plata.

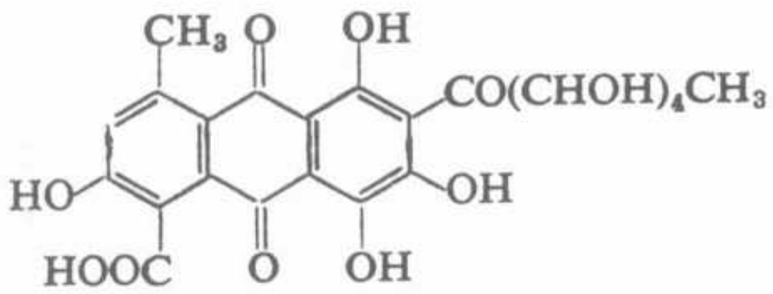
COLORANTES NATURALES

75 160. **Berberina**, básico, se extrae de raíces y de tallos de *Berberis*. Fluorocromo.

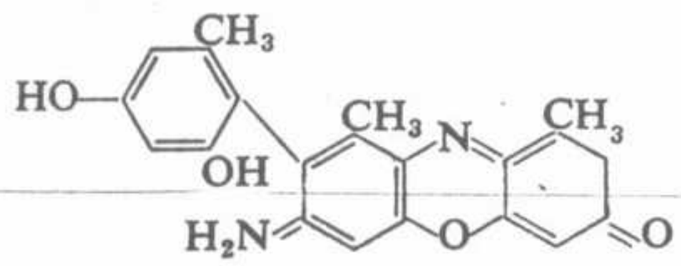
Cochinilla, colorante alcohólico + cloruros cálcicos y alumínicos.

75 470. **Carmín**, es el primer colorante natural utilizado en técnica histológica y el más utilizado todavía.

Ácido carmínico, principio activo de la mezcla de los dos precedentes: ácido.



Orceína, se extrae de algunos géneros de líquenes: *Lecanora* y *Roccella*. Ácido, mezcla de unos ocho isómeros y tautómeros, uno de los cuales tiene de fórmula:

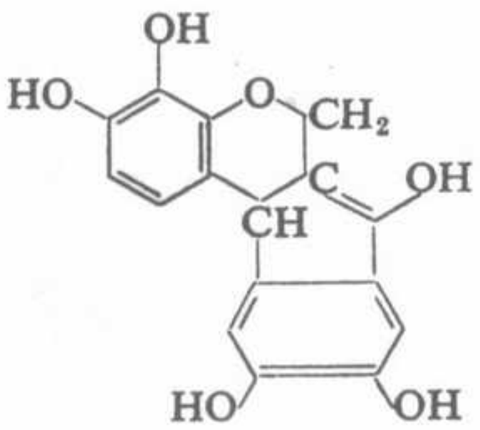


Específica para tinción de núcleos y cromosomas.

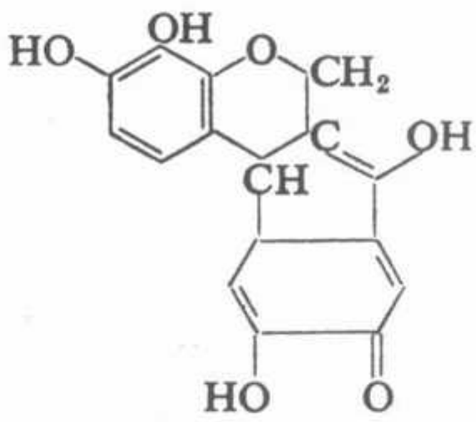
Litmus, muy parecido a la orceína, se extrae también de líquenes.

75 280. **Bracilina**, se extrae de la madera de la Cesalpina.

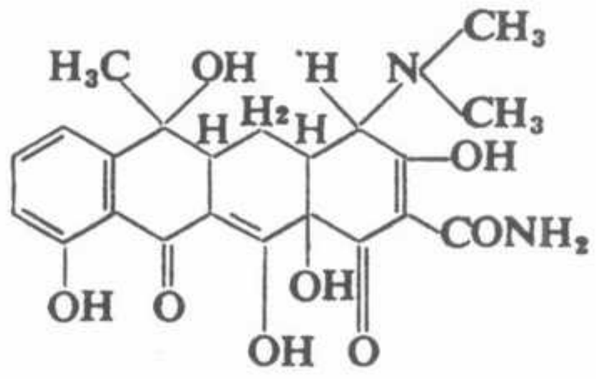
75 290. **Hematoxilina**, extraída del palo de campeche: *Cesalpina campechiana*.



Hemateína, forma oxidada del precedente.

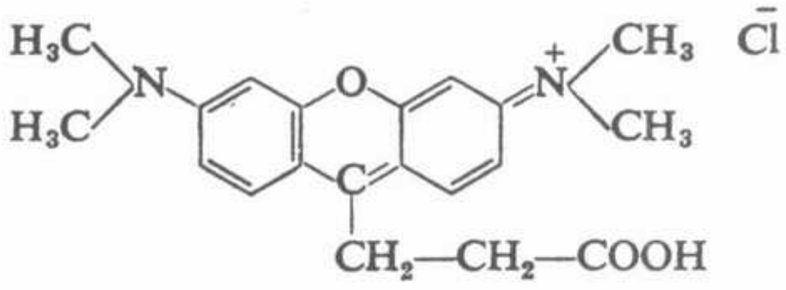


Tetraciclina, fluorocromo.

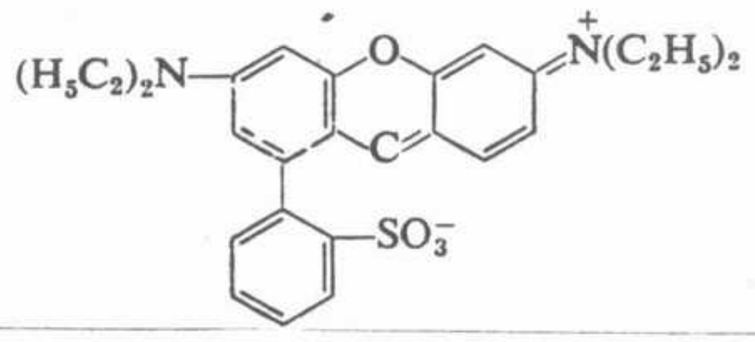


FLUOROCROMOS

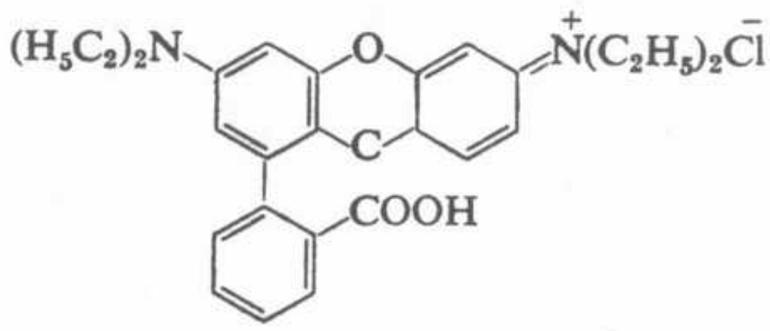
45 050. **Rodamina**, básica.



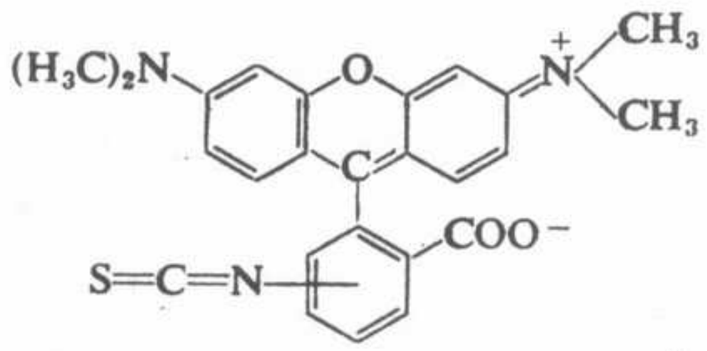
45 100. **Sulforodamina.**



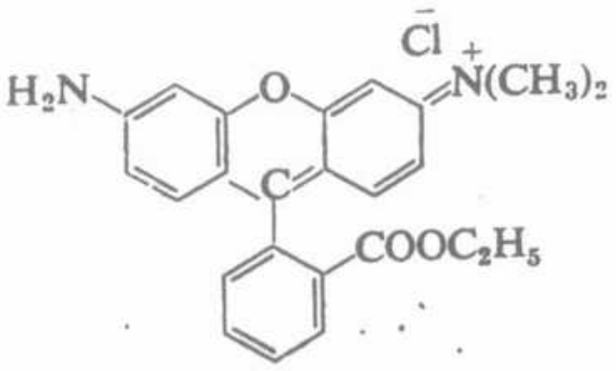
45 170. **Rodamina azulada**, básica, soluble en agua y en alcohol.



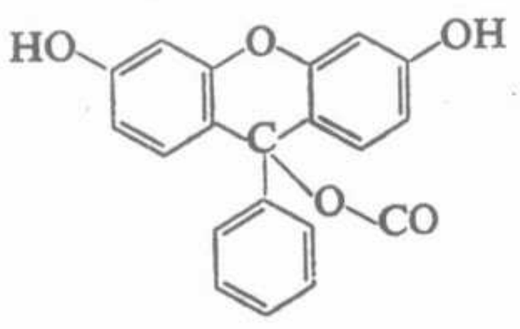
Tetrametilrodamina isotiocianato:



45 210. **Rodamina amarillenta.**



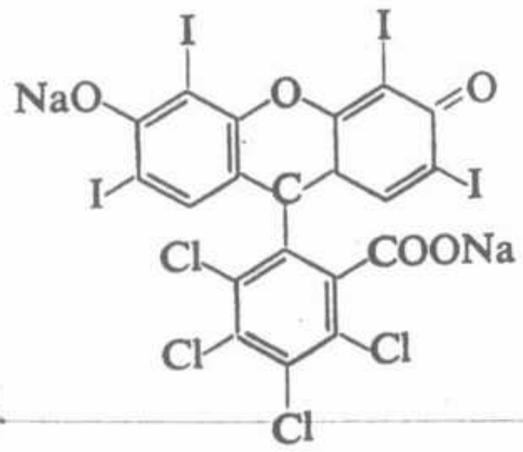
45 350. **Fluoresceína:**



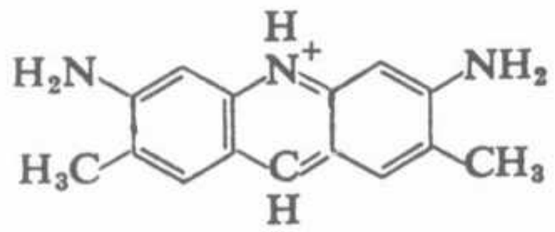
Uranina, sal de sodio de la fluoresceína.
Fluoresceína isotiocianato.

45 380. **Eritrosina amarillenta**, tetrabromofluoresceína.
45 430. **Eritrosina azulada**, indicador fluorescente.

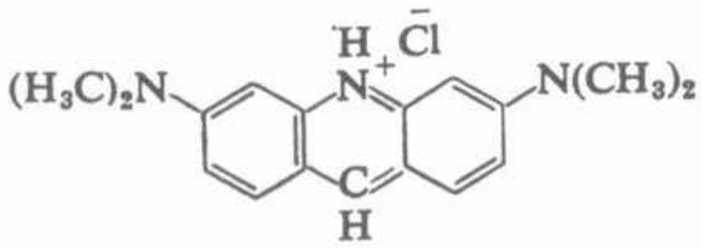
45 440. **Rosa Bengala**, ácido.



46 025. **Amarillo de acridina,** básico.

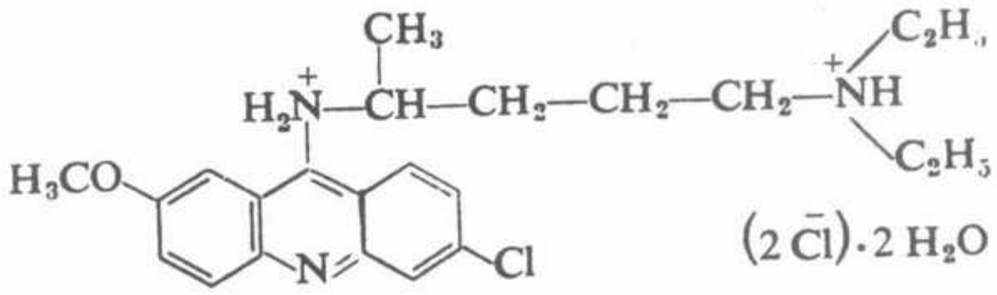


46 005. **Naranja de acridina**, básico.

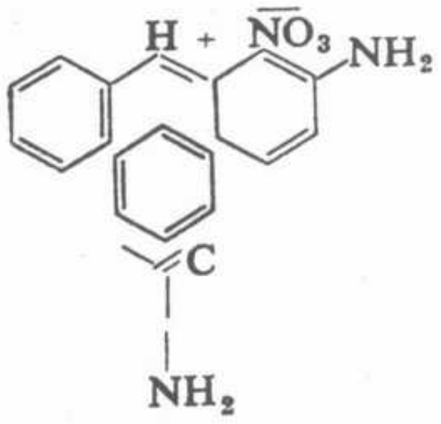


Rivanol, lactato de 6,9-diamino-2-etoxiacridina.

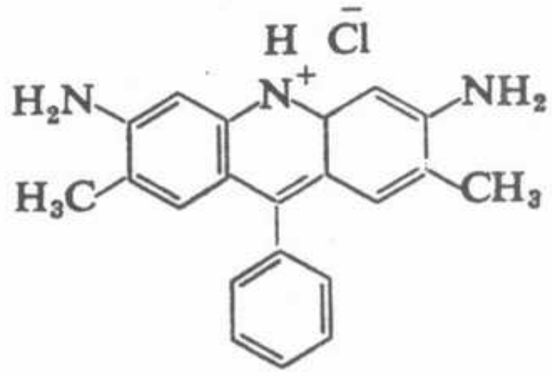
Atebrina-Quinacrina.



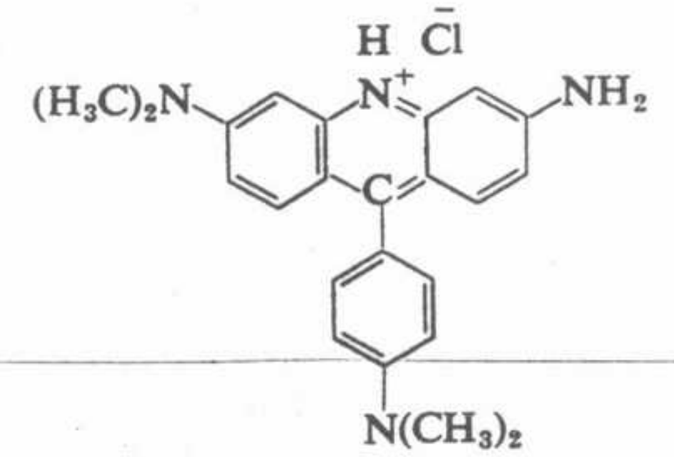
46 045. **Fosfina,** básico.



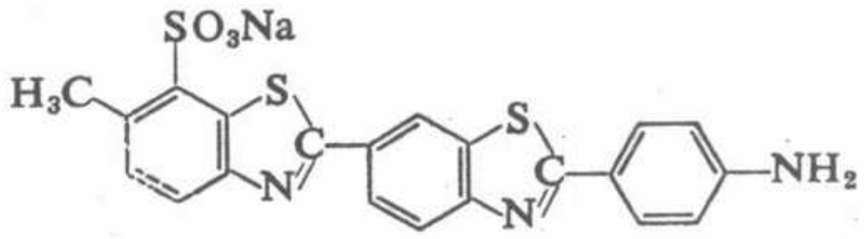
46 065. **Benzoflavina.**



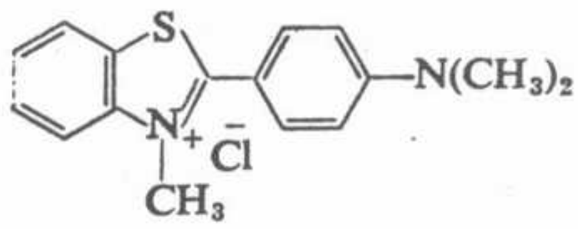
46 075. **Reonina**, básico.



49 000. **Primulina**, ácido.



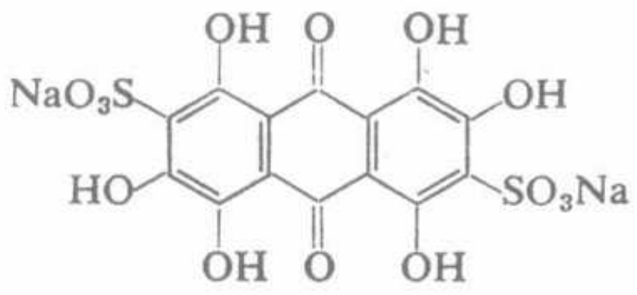
49 005. **Tioflavina**, básico.



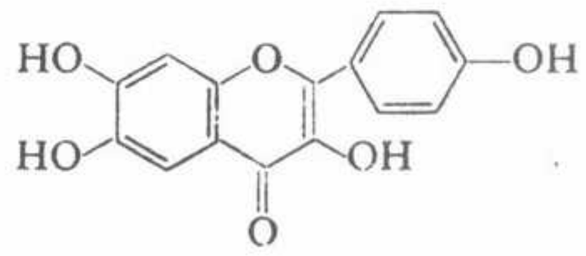
49 010. **Metil primulina**, ácido; derivado metilado y sulfonado de la primulina.

19 540. **Amarillo de tiazol**, ácido.

58 610. **Cianina de alizarina**, ácido.



75 660. **Morín:**



Tetraciclina, hidrosoluble y soluble en etanol.

II. — SINONIMIA DE LOS PRINCIPALES COLORANTES

SINONIMIA DE LOS COLORANTES

En la denominación de los colorantes reina una gran fantasía y ello ha contribuido a crear un gran confusionismo. Hay que tomar la precaución, al citar un colorante, de indicar su fórmula o el número de referencia de la segunda edición del *Color Index* de la Society of Dyers and Colourists, ya que con el mismo nombre pueden designarse dos colorantes bastante distintos, a pesar de ser del mismo fabricante. Un mismo colorante puede tener varios nombres diferentes. Las letras que acompañan una designación deben indicar en principio alguna cualidad, deben matizar alguna característica. Así, en francés, **B:** azulado; **BB** o **2B:** azul; **4B:** muy azul; **6B:** azul intenso; sin embargo, para algunos fabricantes **B** quiere decir British por oposición a **C:** Continental y **A:** Americano; **C** = Cian y también Ciba, y **A:** el primero de una serie o también puede significar: ¡Azur!

Para evitar esta deplorable costumbre sería deseable que el misterio que rodea a determinadas fórmulas por cuestiones comerciales se despejara y que los citólogos supieran con certeza la naturaleza química de los reactivos que usan.

Al comprar un colorante debemos exigir que en la etiqueta del frasco conste la fórmula química o el número del Índice de color (C. I.) correspondiente. Dado que en la mayoría de las publicaciones figuran multitud de sinónimos, hemos elaborado una relación de los principales atendiendo al orden alfabético de los colorantes. Al consultarla, debe recordarse: que no es completa, que el orden no es el mismo al hacer la consulta en alemán, inglés, francés o en español. Generalmente no citamos más que una vez variantes ortográficas muy próximas como: rubin y rubina o celestin, coelestin o celestina. La columna de la izquierda corresponde a los sinónimos, la de la derecha a los nombres castellanos adoptados en la traducción de este Manual, precedidos del número asignado en la segunda edición del Índice de color. Nuestra elección se ha basado en los siguientes criterios: ser lo menos ambiguos posibles, supresión de letras adicionales y su sustitución por el adjetivo correspondiente, conservar las denominaciones que tienen valor genérico, como Congo o Sudán, eliminar los nombres de autores salvo en aquellos casos que son de uso habitual, hemos conservado los nombres tradicionales si no se contradicen con los criterios anteriormente expuestos.

Los nombres adoptados en la columna de la derecha se han incorporado en el índice alfabético general de este Manual, pero no así los sinónimos. Los más importantes se han descrito con sus correspondientes fórmulas en el capítulo de «Colorantes».

Cuando al nombre del colorante no precede ningún número significa que no figura en la relación de la *2.ª edición del Color Index*.

GLOSARIO

A

Acetyl Soudan IV		Acetil Sudán IV
Acid Alizarin Blue BB	58 610	Cianin alizarina
Acid Alizarin Blue GR, BB	63 015	Azul ácido de alizarina
Acid Alizarin Garnet R	14 290	Rojo cromo de antraceno A
Acid Alizarin Red B	16 105	Rojo ácido de alizarina azulada
Acid Alizarin Violet N	15 670	Violeta ácido de alizarina

Acid Anthrapurpurin	58 260	Antrapurpurina ácida
Acid Black 3	27 260	Negro carbón amarillento
Acid Blue 92, R, RL, 3R	13 390	Azul ácido sulfonado rojizo
Acid Blue V	42 051	Azul intenso
Acid Blue 75	42 576	Etiocianina A
Acid Bordeaux	16 180	Bordeaux rojizo
Acid Bright Blue	42 700	Isamina Azul
Acid Congo R	23 570	Rojo vital
Acid fast Violet BG	42 561	Violeta ácido muy azul
Acid Fuchsin	42 685	Rosalina ácida trisulfonada
Acid Fuchsin D	17 200	Azofucsina
Acid Green B extra	42 085	Verde guinea
Acid Green O	10 020	Verde naftol azulado
Acid Green F, C	42 095	Verde luz
Acid Green S	44 090	Verde lanoso sulfuroso
Acid Magenta	42 685	Fucsina ácida
Acid Orange 10	16 280	Anaranjado amarillento
Acid Orange II, Y, A	15 510	Anaranjado II
Acid Orange 52	13 025	Anaranjado de metilo
Acid Orange 20	14 600	Anaranjado I
Acid Phloxine GR	16 570	Cromotropo rubí
Acid Red 88	15 620	Roselina
Acid Red 26	16 150	Ponceau rojizo
Acid Red 31	16 540	Azofucsina amarillenta
Acid Red 106, G	18 110	Rojo de bencilo intenso
Acid Rhodamine B	45 100	Sulforodamina B
Acid Rubin	42 685	Fucsina ácida
Acid Violet	16 600	Rojo lanoso muy azulado
Acid Violet 6B	45 261	Violeta ácido muy azul
Acid Violet 4R	45 190	Violeta ácido muy rojo
Acid Wool Blue RL	13 380	Azul sulfonado ácido rojizo
Acid Yellow D	13 080	Anaranjado IV
Acid Yellow	13 015	Amarillo intenso
Acid Yellow T	19 140	Tartracina
Acid Yellow R	13 065	Amarillo de metalina
Acid Yellow RS	14 270	Tropeolina anaranjada
Acilan Fuchsin G	16 540	Acilán
Acme Yellow	14 270	Tropeolina anaranjada
Acridine Orange NO	46 005	Anaranjado de acridina
Acridine Red 3B	45 000	Rojo de acridina azulado
Acridine Yellow	46 025	Amarillo de acridina
Acriflavine	46 000	Tripaflavina
Acrinol		Rivalol
Alcian Blue 8GX	74 240	Azul alcián
Alcian Fuchsin G	16 540	Azofucsina amarillenta
Alcian Green 2GX		Verde alcián
Alcian Yellow GX		Amarillo alcián
Alizarin	58 000	Alizarina
Alizarin 6	58 205	Purpurina
Alizarin Blue	67 410	Azul de alizarina
Alizarin Blue RBN	51 030	Gallocianina
Alizarin Blue 2RC	58 605	Azul de antraceno
Alizarin Blue S	67 415	Azul de antracianina
Alizarin Bordeaux BA	58 500	Quinalizarina
Alizarin Carmine	58 005	Rojo de alizarina
Alizarin Cyanin BBS	58 610	Cianina de alizarina
Alizarin Green	45 510	Ceruleína sulfúrica
Alizarin Orange	14 030	Amarillo de alizarina rojiza
Alizarin Orange C	58 015	Anaranjado de alizarina
Alizarin P, VI, IE	58 000	Alizarina
Alizarin Purpurin	58 205	Purpurina
Alizarin Red WS, S	58 005	Rojo de alizarina
Alizarin Violet A, R	61 710	Violeta de antraquinona
Alizarin Violet	45 445	Galleína
Alizarin Viridin FF	62 555	Veneno de alizarina
Alizarin Yellow GG	14 025	Amarillo de alizarina amarillento
Alizarin Yellow R	14 030	Amarillo de alizarina rojizo
Alizarol Cyanine RC	43 820	Violeta de cromo

Alkali Blue F	42 750	Metilamino azul
Alkali Blue	42 765	Azul alcalino
Alkali Fast Green	44 025	Verde Erio
Alkali Fast Erio Green	44 025	Verde Erio
Alkanet	75 530	Alcanino
Alkannan	75 520	Alcaneno
Alkannin	75 530	Alcanino
Alpha-Napthol Orange	14 600	Anaranjado I
Alpha-Naphtyl Red	11 350	Rojo de naftaleno
Alphazurin A	42 080	Alfazurina
Alphazurine 2G	42 045	Azul fuerte
Alphazurine FG	42 090	Erioglaucina
Aluminon	43 810	Violeta de cromo
Amanil Garnet H	22 145	Corinto Congo amarillento
Amaranth	16 185	Azorubina sulfúrica
Amethyst Violet	50 225	Violeta amatista
Amido-Black 10B	20 470	Amido negro muy azul
Amidonaphtol Red GA	18 050	Rojo de amido naftol GA
Amidonapthol Red 6B	18 055	Rojo de amido naftol azul intenso
l-Aminoanthraquinone (diazo)	37 275	Rojo intenso AL
l-Aminonaphtalène (diazo)	37 265	Alfanaftilamina
Aminoazobenzène	11 000	Amarillo de anilina
Anchusin	75 530	Alcanina
Anilin Red	42 500	Pararrosanilina
Anilin Blue AS	42 775	Azul de Lyon
Anilinroth	42 500	Pararrosanilina
Aniline Blue WS	42 755	Azul de anilina
Aniline Yellow	11 000	Amarillo de anilina
Anthracene Blue SWX	58 610	Cianina de alizarina
Anthracene Blue SWR	58 605	Azul de antraceno
Anthracene Chrome Red A	14 290	Rojo cromo de antraceno A
Anthracene Navy Blue SWR	58 605	Azul de antraceno
Anthracen Yellow RN	14 030	Amarillo de alizarina rojizo
Anthracyanine S	67 415	Azul de antracianina
Anthrapurpurine	58 255	Antrapurpurina
Anthraquinone Violet, R, 3R, 3RN	61 710	Violeta de antraquinona
Archellin 2B	16 180	Bordeaux rojizo
Astra Blue 4R	74 240	Alcián azul
Astracyanine B	42 705	Astracianina
Astra Violet FF	48 080	Violeta astra
Astrazon Pink	48 015	Rosa de astrazón
Astrazon Red 6B	48 020	Rojo de astrazón
Astrazon Rose FG	48 015	Rosa de astrazón
Atabrine		Atebrina
Auramine O	41 000	Auramina
Auramine G	41 005	Auramina amarillenta
Aurintricarboxylic acid	43 810	Violeta de cromo
Azidin Blue 3B	23 850	Azul tripán
Aurantia	10 360	Aurantia
Aurantia	48 110	Rojo de bencil intenso
Azidin Scarlet R	23 570	Rojo vital
Aurin	43 800	Ácido rosólico
Azoacid Blue B, 4B, 6B	16 545	Azul azo ácido
Azoacid Red L	14 895	Rojo sorbina
Azo Blue	23 680	Azul azo
Azo Bordeaux	16 180	Bordeaux rojizo
Azocarmine B, BX	50 090	Azocarmín azulado
Azocarmine G, GX	50 085	Azocarmín amarillento
Azofuchsin	17 200	Azofucsina
Azofuchsin B	16 550	Azofucsina azulada
Azofuchsin 3B	14 895	Rojo sorbina
Azofuchsin 6B	18 055	Rojo de amidonaftol azulado
Azofuchsin G, GA	16 540	Azofucsina amarillenta
Azofuchsin GN	16 530	Azofucsina anilina
Azofuchsin S	16 535	Azofucsina sulfúrica
Azogrenadine	17 200	Azofucsina
Azophloxine GA	18 058	Rojo de amidonaftol
Azorhodine 3G	14 895	Rojo sorbina
Azorubin	16 185	Amaranta
Azorubin	14 720	Cromotropo FB
Azosol fast Blue HLR, MLB		Azul Luxol intenso

Azure A	52 005	Dimetil tionina
Azure B	52 010	Azurado de metileno
Azure C		Monometil tionina

B

Barberry extract	75 160	Berberina
Basalan Carmine GE	50 085	Azocarmín amarillento
Basalan Carmine BE	50 090	Azocarmín azulado
Basic Blue GO	52 025	Azul de tionina
Basic Brown G, GX, GXP	21 000	Pardo Bismarck amarillento
Basic Brown 1	21 000	Pardo Bismark amarillento
Basic Brown RR, BXN	21 010	Pardo Bismarck rojizo
Basic Fuchsin	42 510	Pararrosanilina
Basic Orange 2	11 270	Crisoidina
Basic Orange 3RN	46 005	Naranja de acridina
Basic Rubin	42 500	Pararrosanilina
Basic Yellow 7	46 020	Corifosfina
Bengal Rose	45 440	Rosa de Bengala
Bengal Rose GTO, N, AT, NT, NTO, B	45 435	Rosa de Bengala amarillento
Bennet's sulfhydryl reagent		Naranja de Mesura
Benzamine Blue 3B	23 850	Azul tripán
Benzo Blue BB	22 610	Azul benzo
Benzo Blue 3B	23 850	Azul tripán
Benzo deep Black RW	30 245	Negro directo profundo
Benzoin Blue R	23 680	Azul azo
Benzo new Blue 2B	23 690	Azul dianil azulado
Benzopurpurin	23 500	Benzopurpurina
Benzo fast Violet NC	22 570	Violeta benzo intenso
Benzoflavin	46 065	Benzoflavina
Benzo Sky Blue	24 400	Azul celeste benzo
Benzopurpurin 4B	23 500	Benzopurpurina
Benzyl fast Red B	18 110	Rojo de bencilo intenso
Benzyl Orange 2R	22 195	Naranja de bencilo
Benzyl Violet		Violeta de bencilo
Berberin	75 160	Berberina
Berlin Blue	77 510	Azul de Prusia
Bernthsen's Methylène Violet		Violeta de metileno según Bernthsen
Biebrich Scarlet WS	26 905	Escarlata Biebrich
Binchschedler's Green	49 405	Verde Binchschedler
Bismarck Brown GOOO, 53A, R	21 010	Pardo Bismarck rojizo
Bismarck Brown 53B	21 030	Pardo fénix rojizo
Bismarck Brown Y	21 100	Pardo Bismarck amarillento
Black NK	37 190	Negro intenso K
Black BS	37 245	Negro intenso azulado
Blazing Red	12 085	Rojo permanente
Bleu BZL		Azul BZL
Bleu V, VN, VS, 2G, GS, XV	42 045	Azul patente
Bleu V, B, VB, NS, NSV	37 255	Azul intenso, azul violáceo
Bleu 6B	24 410	Azul Chicago muy azul
Bleu BB, BBS, 2BS, 11BB	37 175	Azul intenso azulado
Bleu R, RL, 3R	13 390	Azul ácido sulfúrico rojizo
Bleu Tetrazolium		Azul tetrazolio
Bleu RR, NRR	37 155	Azul intenso rojizo
Bleu RW	24 280	Azul Chicago rojizo
Bleu à l'eau	42 755	Azul de anilina
Bleu Coton C4B	42 780	Azul de metilo
Bleu BZL		Azul BZL
Bleu de Crésyle 2RN	51 010	Azul de cresil brillante
Bleu de Chinoline		Cianina
Bleu Direct 2B	22 610	Azul diamina azulada
Bleu Lumière	42 775	Azul de anilina

Bleu Coton	42 775	Azul de anilina
Bleu de Lyon	42 755	Azul de anilina
Bleu de Lyon	42 755	Azul de Lyon
Bleu d'Anthracène SWX	58 610	Azul de alizarina ácida
Bleu de Gentiane 6B	42 755	Azul de anilina
Bleu de Paris	42 755	Azul de anilina
Bleu Helvétia	42 780	Azul de metilo
Bleu Marine W	42 755	Azul de anilina
Bleu Marine	37 195	Azul oscuro rojizo
Bleu Méthasol		Azul Luxol sólido
Bleu nouveau R	51 175	Azul de Meldola
Bleu patenté	42 051	Azul intenso
Bleu Pontacyl brillant V	42 051	Azul Neptuno
Bleu soluble 3M	42 755	Azul de anilina
Bleu Suisse	42 015	Azul de metileno
Bleu de Chine	42 755	Azul de anilina
Bordeaux	16 185	Amaranta
Bordeaux B, BL, G	16 180	Bordeaux rojizo
Bordeaux R	14 290	Rojo cromo de antraceno A
Bordeaux R	16 180	Bordeaux rojizo
Bordeaux SF	16 185	Amaranta
Bordeaux Red	16 180	Bordeaux rojizo
Bordeaux GP, IV	37 135	Bordeaux intenso
Bordeaux salt II	37 210	Granate intenso GBC
Brazilin	75 280	Bracilina
Brazilin	72 280	Bracilina
Brentamine	37 220	Corinto intenso violáceo
Brentamine fast Corinth V	37 220	Corinto intenso violáceo
Brentamine fast Red LTR	37 150	Rojo intenso LTR
Brenthol BA	37 532	Naftol AS-BA
Brilliant Black	27 260	Negro carbón amarillento
Brilliant Blue B	43 830	Azul cromoxano
Brilliant Blue 6B	24 410	Azul Chicago muy azul
Brilliant Blue C	51 010	Azul de crésil brillante
Brilliant Congo Blue RRW	23 745	Azul Congo brillante azulado
Brilliant Congo R	23 570	Rojo vital
Brilliant Congo Red R	23 570	Rojo vital
Brilliant Crésyl Blue	51 010	Azul de crésil brillante
Brilliant Crocein MOO	27 290	Croceína brillante
Brilliant Crocein Scarlet MOO, M	27 290	Croceína brillante
Brilliant fast Brown B	12 020	Pardo Sudán azulado
Brilliant fast Scarlet B	12 150	Rojo Sudán amarillento
Brilliant Green	42 040	Verde brillante
Brillant Orange	26 520	Naranja cromo amarillo-rojizo
Brilliant Orange ON	16 011	Naranja brillante ON
Brilliant Orange R	16 020	Naranja brillante rojizo
Brilliant Paper Yellow	24 890	Amarillo brillante
Brilliant Pink B	45 170	Rodamina B
Brilliant Ponceau G	16 150	Ponceau rojizo
Brilliant pure Blue 8G	42 700	Azul isamina
Brilliant Purpurin R	23 510	Púrpura brillante
Brilliant Red B	18 110	Rojo de bencil intenso
Brilliant Reinblau 8G, 8GZ	42 700	Azul isamina
Brilliant Sky Blue 8GA, 8G, 8GZ	42 700	Azul isamina
Brilliant Vital Red	23 570	Rojo vital
Brilliant Yellow	24 890	Amarillo brillante
Brilliant Yellow S	13 085	Amarillo brillante sulfúrico
Bromo acid J, TS, XL, XX	45 380	Eosina
Bromofluorescein	45 380	Eosina
Bronze Bromo ES	45 380	Eosina
Brown G	30 140	Pardo Congo amarillento
Brown R, AT, C, N	21 010	Pardo Bismarck rojizo
Brown RR		
Brown Salt		
Brown Salt		
Brown Salt		
Brun à grais		
Brun à huile		
Brun excelsi		
B. T.		
Buffalo Bla		
Buffalo Gar		
Butter Yello		
Calcazine R		
Calcium Re		
Calcium Re		
Calcoid Gre		
Calcozine R		
Canary Yel		
Capri Blue		
Capri Blue		
Carbide fas		
Carbon		
Carbon Bla		
Cardinal R		
Carméine		
Carmine		
Carmine na		
Carminic a		
Carmoisine		
LAS, S,		
Carmoisine		
Carycinel		
Celestin Bl		

Brown RR	37 020	Pardo intenso rojizo
Brown Salt III	37 120	Rojo intenso continental
Brown Salt IV, D	37 130	Escarlata intenso rojizo
Brown Salt R	11 270	Crisoidina
Brun à graisse	12 020	Pardo liposoluble
Brun à huile D	12 020	Pardo liposoluble
Brun excelsior	21 010	Pardo Bismarck
B. T.		Azul tetrazolium
Buffalo Black NBR	20 470	Amido negro muy azul
Buffalo Garnet R	22 145	Corinto Congo amarillento
Butter Yellow	11 020	Amarillo liposoluble

C

Calcazine Red GG	45 160	Rodamina muy amarillenta
Calcium Red		Rojo para calcio
Calcium Red	60 076	Rubina helioestable
Calcoid Green S extra	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Calcozine Red 6G extra	45 160	Rodamina muy amarillenta
Canary Yellow	41 000	Auramina
Capri Blue GN	51 000	Azul Capri
Capri Blue GON	51 015	Azul Capri metilado
Carbide fast Black G	35 435	Cotonerol
Carbon	77 266	Negro carbón
Carbon Black G	27 250	Negro carbonoso amarillento
Cardinal Red	15 620	Rocelina
Carméine		Oxicarmín
Carmine	75 470	Carmín
Carmine naphta	11 920	Naranja Sudán amarillento
Carminic acid		Ácido carmínico
Carmoisine B, BA, LAS, S, W	14 720	Cromotropo FB
Carmoisine 6R	16 570	Cromotropo rubescente
Carycinel Red		Rojo caricinel
Celestin Blue B	51 050	Celestina azul
Celliton fast Red Violet RN	61 100	Violeta Sudán
Cerasine	15 620	Rocelina
Cerasine R	16 180	Bordeaux rojizo
Cerasin Red	26 100	Sudán III
Cerotin Orange	11 320	Etoxaceno
Cerotin Ponceau 3B	26 105	Sudán IV
Cerulean Blue	77 368	Azul cobalto
Chelating Tetrazole MTT		Metiltiazolil difenil tetrazolio
Chicago Blue 6B	24 410	Azul Chicago
Chicago Blue RW	24 280	Azul Chicago rojizo
China Blue	42 775	Azul de anilina
Chinese Blue	77 510	Azul de Prusia
Chinese Vermillion	77 766	Bermellón
Chloranilic acid		Acido cloranílico
Clorantine fast Red 5B, K	28 160	Rojo Siria muy azul
Chlorantine fast Red 7 BLN, 5 BRL	35 780	Rojo Siria azulado
Chlorazol Black E	30 235	Negro de clorazol
Chlorazol Black GF, GFP	35 435	Cotonerol
Chlorazol Blue 3B	23 850	Azul tripán
Chlorazol Pink Y	14 780	Rojo tiacino amarillento
Chlorazol Violet N	22 570	Violeta benzo intenso
Chrome Azurol S	43 825	Azul de ditolilfenilmetano
Chrome Black A, B	16 110	Negro salicino
Chrome Black F, J	26 695	Negro diamante oscuro
Chrome Blue BA, FB, FRS, R, 2R	14 720	Cromotropo FB
Chrome Blue GCB	51 030	Gallocianina
Chrome Brown C	57 030	Cromógeno
Chrome Cyanine R	43 820	Cianina de cromo
Chrome fast Blue C	43 830	Azul de cromoxano
Chrome fast Blue R	14 835	Cromotropo F4B
Chrome fast Bordeaux	14 290	Rojo cromo de antraceno A
Chrome fast Orange GR, G, R	26 520	Naranja cromo amarillo rojizo

Chrome fast Red B	18 760	Rojo eriocromo azulado
Chrome Orange	77 601	Naranja de cromo
Chrome Orange GR	26 520	Naranja de cromo rojizo
Chrome printing Violet	43 810	Violeta de cromo
Chrome Red B	18 760	Rojo eriocromo azulado
Chrome Violet, C, CG	43 810	Violeta de cromo
Chrome Violet B	15 670	Violeta ácido de alizarina
Chrome Yellow	77 600	Amarillo de cromo
Chromogen I, C, N	57 030	Cromógeno
Chromogen Black ETOO	14 645	Negro cromógeno
Chromotrope 2B	16 575	Cromotropo azulado
Chromotrope NRR	16 570	Cromotropo rojizo
Chromotrope FB	14 720	Cromotropo FB
Chromotrope Blue RR, 2R	16 570	Cromotropo rubescente
Chromotrope F4B	14 835	Cromotropo F4B
Chromotrope Red 4B	16 575	Cromotropo azulado
Chromoxane Cyanine R	43 820	Cianina de cromo
Chromoxane pure Blue BLD	43 825	Azul de ditolil-fenilmetano
Chromoxane pure Blue B	43 830	Azul de cromoxane
Chrysoidin Y, G, A	11 270	Crisoidina
Chrysoïdine	14 270	Tropeolina anaranjada
Chrysoïdine R, RL	11 320	Crisoidina rojiza
Chrysoin	14 270	Tropeolina anaranjada
Ciba Blue	45 510	Ceruleína sulfúrica
Cinnabre	77 766	Bermellón
Clayton Yellow	15 540	Amarillo de tiazol
Cobalt Blue	77 368	Azul cobalto
Cochineal	75 470	Cochinilla
Coccinel Red		Rojo coccinela
Coelestin Blue	77 368	Azul cobalto
Coelin	77 368	Azul cobalto
Coeruleum	77 368	Azul cobalto
Congo	22 120	Rojo Congo
Congo Blue 3B	23 850	Azul tripán
Congo Red	22 120	Rojo Congo
Congo Brown G	30 140	Pardo Congo amarillento
Congo Corinth G		
Coréine 2R	51 050	Azul celestina
Corinth Brown G	22 145	Rojo corinto amarillento
Coriphosphine O	46 020	Corifosfina
Corn Blue B	44 040	Azul Victoria rojiza
Corn Blue BN	44 045	Azul Victoria azulada
Cotonerol A, EX	35 435	Cotonerol
Cotton Blue	42 755	Azul de anilina
Cotton Blue	42 780	Azul de metilo
Cotton Corinth G	22 145	Corinto Congo amarillento
Cotton Red 4B	23 500	Benzopurpu-rina muy azulado
Cotton Red	50 240	Safranina
Cotton Red B, C	22 120	Rojo Congo
Cresyl Blue 2RN, BBS	51 010	Azul cresil brillante
Cresyl echt Violet		Violeta de cresil intenso
Cresyl fast Violet		Violeta de cresil intenso
Cresyl Violet acetate		Violeta de cresil acetato
Crocein Orange G	15 970	Naranja de croceína amarillento
Crocein Scarlet	26 905	Escarlata de Biebrich
Crocein Scarlet 7B	27 165	Escarlata de croceína
Crocein Scarlet MOO, 5B, MO, M	27 290	Croceína brillante
Crystal Orange GG	16 230	Naranja amarillento
Crystal Ponceau 6R	16 250	Cristal Ponceau, rojo intenso
Crystal Violet	42 555	Cristal violeta
Curcumin S	40 000	Amarillo de diamina intenso
Curcumin	75 300	Curcumina
Curcumine	13 085	Amarillo brillante antiguo
Cyanine 1		Azul de quinolina
Cyanine R	43 820	Cromocia-nina

Cyanine acid Blue	13 380	Azul ácido sulfonado rojizo
Cyanol	43 535	Cianol
Cyanol Green B	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Cyanosine	45 410	Floxina
Cyanosine	54 410	Floxina azulada

D

Dahlia	42 530	Violeta Hofmann
Dahlia B	42 535	Violeta de metilo
Dark Brown Salt R	11 270	Crisoidina
Darrow Red		Rojo Darrow
Delta Dye indicator	14 890	Amarillo de nitrazol
Diamine Blue 2R, 3R, C, BB	24 020	Azul de diamina rojizo
Diamine Bordeaux CGN	22 145	Corinto Congo amarillento
Diamine fast Yellow A	40 000	Amarillo de diamina intenso
Diamine purpurin 3B	23 570	Rojo vital
Diamine Red 4B	23 500	Benzopurpurina muy azulado
Diamine Violet N	22 570	Violeta benzo intenso
Diamond Black F	26 695	Negro diamante intenso
Diamond Flavine G	14 135	Flavina diamante amarillento
Diamond Green B, BX, & extra	42 000	Verde malaquita
Diamond Green G	42 040	Verde brillante
Diamond Red ECB	18 760	Rojo eriocromo azulado
Dianil Blue 2R	23 690	Azul dianil azulado
Dianil Blue H3G	23 850	Azul tripán
Dianil Red 4B	23 500	Benzopurpurina muy azulado
Dianisidine Blue	37 235	Azul intenso azulado
Dianthine B	45 430	Eritrosina azulada
Dianthine G	45 425	Eritrosina amarillenta
	37 040	Rojo intenso amarillento
Diazine Black R	11 825	Negro Janus
Diazine Blue G	17 940	Azul brillante metacromático azulado
Diazo Blue B	37 235	Azul intenso azulado
Diazo Blue RR	37 155	Azul intenso rojizo
Diazo fast Blue RR	37 155	Azul intenso rojizo
Diazo fast Red GL	37 110	Rojo diazo
Diazo fast Corinth LB	37 160	Corinto intenso
Diazo fast Blue BB	37 175	Azul intenso azulado
Diazo fast Violet B	37 165	Violeta intenso azulado
Diazo fast Red 3G, 3GL	37 040	Rojo intenso amarillento
Diazo Green S	11 050	Verde Janus azulado
Diazo Garnet GC	37 215	Granate intenso GC
Diazo Red 3G	37 120	Rojo intenso continental
Diazo Red RC		
Diazo Red G	37 110	Rojo diazo
Diazo Scarlet R	37 130	Escarlata intenso rojizo
Diazo Violet		Paranitrobenceno azoresorcinol
Diffuzione		Difenil tiocarbazone
Dimethylglyoxime		Dimetilglioxime
Dithioxamide		Ácido rubeánico
Double Scarlet BSF	26 905	Escarlata Biebrich
Double Green SF	42 585	Verde de metilo
Durazol brilliant Red B	35 780	Rojo Sirius azulado
Durazol Red 2B	28 160	Rojo Sirius muy azul
Dimethylphenosafranine	50 205	Violeta de metileno
Diphénylthiocarbazone		Ditiozone
Dipicrylamine	10 360	Aurantia
Direct Black MS, RL, E, GX, EE, 2V, F, A	30 235	Negro de clorazol
Direct deep Black EW extra, EA, EAD	30 235	Negro de clorazol
Direct Black RW, R, Mr,	30 245	Negro directo

D, RWN, 3RX, 4RX		profundo
Direct Blue 2B	22 160	Azul benzo azulado
Direct brillant Blue 8G	42 700	Azul isamina
Direct deep Black E	30 235	Negro de clorazol
Direct deep Black RW extra	30 245	Negro directo profundo
Direct Garnet R	22 145	Corinto Congo amarillento
Direct Purple	24 865	Púrpura de Hesse
Direct Red 15	23 510	Purpurin brillante rojiza
Direct Red 34	23 570	Rojo vital
Direct Red 48	14 930	Geranina azulada
Direct Red 4B	23 500	Benzopurpurina muy azulado
Direct Red C, R, Y	22 120	Rojo Congo
Direct Steel Blue BB	23 690	Azul dianil azulado
Direct Violet C	22 145	Corinto Congo amarillento
Direct Violet B	23 680	Azul azo
Direct Violet 1N	22 570	Violeta benzo intenso

E

Escarlate à Huile	12 140	Sudán III
Escarlate Cérol BX		Escarlata Cérol
Ecarlate R	26 105	Sudán IV
E.D.T.A.		Ácido etilendiamino tetracético
Emerald Green Crystals	42 040	Verde brillante
Eosin	45 380	Eosina amarillenta
Eosin AS, S	45 386	Etioleosina
Eosin B, BN, BA, BB, BW, DHV	45 400	Eosina azulada
Eosin J	45 430	Eritrosina azulada
Eosin alcohol soluble	45 386	Etileosina
Eosin Scarlet B	45 400	Eosina azulada
Eosin Y, WG, WSY, B extra, BP, BS, J extra, 3J, 4S, J5F, KS, S, YAS	45 380	Eosina amarillenta
Eosine 10B	54 410	Floxina azulada
Eosine à l'alcohol	45 386	Etileosina
Eosine W, WG, Y	45 380	Eosina amarillenta
Eosine à l'èau	45 380	Eosina amarillenta
Erie Black GXOO, B, BF	30 235	Negro de clorazol
Erie Black RB, RW	30 245	Negro directo profundo
Erie fast Black G	35 435	Cotonerol
Erie Garnet B, GW	22 145	Corinto Congo amarillento
Erie Violet 3R	22 570	Violeta benzo intenso
Eriochrome Black A	16 110	Negro Salicine
Eriochrome Black T	14 645	Negro cromógeno
Eriochrome Blue Black B	15 705	Negro cromo Palatino 6BN
Eriochrome Blue SE	16 680	Azul mordiente intenso
Eriochrome Bordeaux	14 290	Rojo cromo de antraceno A
Eriochrome Cyanine R	43 820	Violeta de cromo
Eriochrome Red B	18 760	Rojo eriocromo azulado
Eriocyanine A	42 576	Violeta de formilo
Eriocuanine A	42 561	Violeta ácido muy azul
Erioglaucine	42 090	Erioglaucina
Eriogreen B	44 025	Verde naftaleno
Eriorubin G	14 895	Rojo sorbina
Eriorubine G	14 895	Azogrenadina sulfúrica
Erythrosin BB, B extra	45 405	Floxina
Erythrosin B, N, JN	45 430	Eritrosina azulada
Erythrosin BB, B, extra	45 405	Floxina
Erythrosin Y, GG, R, G, 6G	45 425	Eritrosina amarillenta
Ethoxazène		Paraetoxicrisoidina
Ethyl eosin	45 386	Etileosina
Ethyl Green	42 040	Verde brillante
Ethyl Green	42 590	Verde etilo
Ethyl Orange		Naranja de etilo
Ethyl Purple 6B	42 600	Violeta de etilo
Ethyl Red		Rojo de etilo
Ethyl Red		Rojo de diquinolina

Ethyl Violet	42 600	Violeta de etilo
Euchrysine 3RXA	46 005	Naranja de acridina
Euflavine	46 000	Acriflavina
Evans Blue		Azul de Evans
Excelsior Brown	21 000	Pardo Bismarck amarillento

F

Fast acid Blue R	45 205	Azul ácido intenso rojizo
Fast acid Blue R, RL, 3R	13 390	Azul ácido sulfonado rojizo
Fast acid Green N	42 095	Verde luz
Fast acid Violet 10B	42 571	Violeta ácido intenso
Fast acid Violet ARR, 3RL, ALR, R	45 190	Violeta ácido intenso rojizo
Fast Black K	37 190	Negro intenso K
Fast Black B	37 245	Negro intenso azulado
Fast Blue B, OB, R, 2R	50 405	Indulina hidrosoluble
Fast Blue 3R	51 175	Neoazul rojizo
Fast Blue B, BN	37 235	Azul intenso azulado
Fast Blue BB, 2B, EB, BBN	37 175	Azul intenso azulado
Fast Blue RR	37 155	Azul intenso rojizo
Fast Blue VB, MB, BL	37 255	Azul intenso azul-violáceo
Fast Blue GR	42 563	Azul Victoria muy rojo
Fast Bordeaux GP, GDN, 3NA, NGP, GPS, GPN	37 135	Bordeaux intenso
Fast Brown V, VA	37 200	Pardo intenso violáceo
Fast Brown III	12 020	Pardo Sudán azulado
Fast Brown RR	37 020	Pardo intenso rojizo
Fast Brown G, G2R, RLH, GR, RZ	30 140	Pardo Congo amarillento
Fast Brown D	14 600	Naranja I
Fast Corinth LB	37 160	Corinto intenso
Fast Corinth V	37 220	Corinto intenso violáceo
Fast Crimson GR	18 050	Rojo de amidonaftol GA
Fast dark Blue R	37 195	Azul oscuro intenso rojizo
Fast Fuchsin G, XL	16 570	Cromotropo rubescente
Fast Fuchsin 6B	16 600	Rojo lanoso muy azulado
Fast Garnet GBC	37 210	Granate intenso GBC
Fast Garnet B	37 265	Alfanafti-lamina
Fast Garnet GBC base	11 160	Granate intenso GBC básico
Fast Garnet GC, AC	37 215	Granate intenso GC
Fast Green FCF	42 053	Verde intenso FCF
Fast Green O	10 000	Verde intenso O
Fast Light Green	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Fast Mordant Blue B	16 680	Azul mordiente intenso
Fast new Blue 3R	51 175	Neoazul rojizo
Fast oil Brown S	12 026	Pardo Sudán azulado
Fast oil Orange II	12 140	Sudán II
Fast Oil Yellow B	11 020	Dimetilamino-azobenceno
Fast Orange O, JR	37 025	Naranja intenso, amarillo rojizo
Fast Orange GR, O, JR	37 025	Naranja intenso, amarillo rojizo
Fast Orange I, 4A, G, R, RS	12 055	Naranja Sudán rojizo
Fast Phosphine NAL	46 075	Reonina
Fast Pink, B, 2B, 4B	25 380	Rosa Sirius azulado
Fast Ponceau 2B	27 195	Ponceau sulfúrico
Fast Printing Green	10 005	Verde naftol amarillento
Fast Red TR, 5CT, TRN	37 085	Rojo intenso rojizo
Fast Red B, 5B, 8B	35 780	Rojo Sirius azulado
Fast Red B, 5NA, BN, E	37 125	Rojo intenso azulado
Fast Red 2J	37 035	Rojo intenso amarillento
Fast Red GG, 2G	37 035	Rojo intenso amarillento
Fast Red 2NC, 3JL, NBGL	37 040	Rojo intenso amarillento

Fast Red B, BN, P	16 180	Bordeaux rojizo
Fast Red RC, 4CA, RS, RCS	37 120	Rojo intenso continental
Fast Red	16 185	Amaranta
Fast Red ITR, ITRN	37 150	Rojo intenso LTR
Fast Red RL, NRL	37 100	Rojo intenso débil
Fast Red AL	37 275	Rojo intenso AL
Fast Red A, AG, ALS, AV, MA, S	15 620	Rocelina
Fast Red salt TA, TRS, IX	37 085	Rojo intenso rojizo
Fast Red salt	37 275	Rojo intenso AL
Fast Red salt B	37 125	Rojo intenso azulado
Fast Red salt 3G	37 040	Rojo intenso amarillento
Fast Red Violet LB		Violeta rojo intenso
Fast Rose, B, 2B, 4B	25 380	Rosa Sirius azulado
Fast Scarlet R, 4NA, RC, RN	37 130	Escarlata intenso rojizo
Fast Scarlet GGS, GGN, 2J, DS	37 010	Escarlata intenso amarillento
Fast Scarlet GG	37 010	Escarlata intenso amarillento
Fast Violet N	22 570	Violeta benzo intenso
Fast Violet	51 030	Gallocianina
Fast Violet B, BN	37 165	Violeta intenso azulado
Fast Wool Blue R	13 390	Azul ácido sulfúrico rojizo
Fast Yellow FY, G, S, BG	13 015	Amarillo intenso
Fat Blue G	44 045	Azul Victoria azulado
Fat Blue 4R	42 563	Azul Victoria muy rojo
Fat Oil Yellow	11 000	Amarillo de anilina
Fat Orange I	12 055	Naranja Sudán rojizo
Fat Orange G, GS, RG	11 920	Naranja Sudán amarillento
Fat Ponceau G	26 100	Sudán III
Fat Ponceau R, LB	26 105	Sudán IV
Fat Ponceau	12 140	Sudán II
Fat Yellow A, AD, ES, R	11 020	Amarillo liposoluble
Fire Red	12 085	Rojo permanente
Flaming Red	12 085	Rojo permanente
Flavianic Acid	10 316	Amarillo naftol sulfúrico
Flavine	46 000	Acriflavina
Flavophosphine N	46 065	Benzoflavina
Flazo Orange	45 350	Fluoresceína
Fluorescein		Naranja Flazo
Fluorescent Blue	51 400	Lacmoide
Food Green 3	42 053	Verde intenso FCF
Food Orange 3	11 920	Naranja Sudán amarillento
Food Red 6	16 155	Ponceau GR 11
Formyl Violet S4B	42 650	Formil violeta
Fuchsin S, SN, SS, ST, SIII	42 685	Rosanilina ácida trisulfonada
Fuchsin acid	42 685	Rosanilina ácida trisulfonada
Fuchsin NB	42 520	Neofucsina
Fuchsine basique	42 500	Pararrosanilina
Fuchsine paraldéhyde		Pararrosanilina diparaldehído

G

Gallamin Blue	51 045	Azul de gallamina
Gallein	45 455	Galleína
Garnet GB, GBC, G	51 040	Azul Gallo
	51 030	Gallocianina
Gallo Blue F	37 210	Granate intenso, sulfato
Gallocyanin		
Garnet GC, GCD, AC	37 215	Granate intenso clorado
Gambine R	10 010	Gambina
Genacryl Pink G	48 015	Rosa astrazón
Genacryl Red 6B	48 020	Rojo astrazón
Gentiana Blue 6B	42 775	Azul de Lyon
Gentian Violet	42 555	Cristal violeta
Gentian Violet	42 535	Violeta de metilo
Geranine B	14 930	Geranina azulada
Geranine G	19 930	Geranina amarillenta

Gold Orange	15 510	Naranja II
Gold Orange	16 230	Naranja G
Gold Orange MP	13 025	Naranja de metilo
Gold Yellow	14 270	Tropeolina anaranjada
Gossypimine	50 240	Safranina
Gray R, B, BB	50 420	Nigrosín sulfúrico
Green PL	10 020	Verde naftol azulado
Guinea Green B	42 085	Verde Guinea

H

Haematine	75 280	Bracilina
Hélianthine	13 025	Naranja de metilo
Helioechtrubin BBL	60 760	Rubina helioestable
Helioechtrubin 4BL	58 055	Ácido rufiánico
Helio Fast Rubin BBL	60 760	Rubina helioestable
Heliotrop B	50 225	Violeta amatista
Helvetia Blue	42 780	Azul de metilo
Hematein		Hematеína
Hematoxylin	75 290	Hematoxilina
Heptametoxy Red		Rojo heptametoxílico
Hessian Bordeaux	24 860	Bordeaux de Hesse
Hessian Purple N	24 865	Púrpura de Hesse
Hexamethoxy Red		Rojo de hexametóxilo
Hexaméthyl Violet	42 555	Cristal violeta
Herxheimer's Oil Blue		Azul de Herxheimer
Hirckson Purple		Púrpura de Hirckson
Hofmann's Violet	42 530	Violeta de Hofmann

I

Imperial Yellow	10 360	Aurantia
Indazol Blue R, 3B	12 210	Azul indazol rojizo
India Ink		Tinta China
Indian Blue 2RD	51 175	Neoazul rojizo
	73 000	Índigo
Indigo Blue	73 015	Indigocarmín
Indigocarmine	73 015	Indigocarmín
Indigotine 1,1a	12 210	Azul de Indazol
Indoine Blue BB, R, BR, RR	12 210	Azul de Indazol rojizo
Indophène Blue		
Indole Blue B, R	12 210	Azul de indazol rojizo
Indophènol Blue	49 700	Indofenol
Indulin Green	50 405	Indulina hidrosoluble
Indulin Black	50 420	Nigrosín
Indulin spirit soluble	50 400	Indulina
Indulin water soluble	50 405	Indulina hidrosoluble
Ink Blue PP, ASB I.N.T.	24 410	Azul Chicago Yodonitrotetrazolium
Iodeosin B	45 430	Eritrosina azulada
Iodeosin G	45 425	Eritrosina amarillenta
Iodine Green	42 556	Verde yodo
Iodine Violet	42 530	Violeta de Hofmann
Iodonitrotetrazolium INT		Yodonitrotetrazolium
Iris Blue B	51 400	Azul Iris
Iris Violet	50 225	Violeta amatista
Isamine Blue	42 700	Azul Isamina
Isohematein		Isohematеína
Isopicramic acid		Ácido isopicrámico
Isorubin	42 520	Neofucsina

J

Janus Black	11 825	Negro Janus
Janus Blue G	12 211	Azul Janus
Janus Green B	11 050	Verde Janus azulado
Janus Red B	26 115	Rojo Janus azulado
Janus Yellow G	26 060	Amarillo Janus
Janus Yellow R	26 140	Amarillo Janus rojizo
Jaune acide RS, 116, TS	14 270	Tropeolina anaranjada
Jaune de Beurre	11 020	Amarillo sólido azulado
Jaune Impérial	10 360	Aurantia
Jaune de Martius	10 315	Amarillo de Mars
Jaune solide F. Y. G. S.	13 015	Amarillo sólido
Java Scarlet R	27 195	Escarlata Java

Jodeosin B	45 430	Eritrosina azulada

K

Kernechtrot		Rojo cálcico
Kernechtrot	60 760	Rubina helioestable
Keshar	75 100	Safranina
Ketone Blue 4BN	43 530	Azul acetona
Kiton Green S	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Kiton Red S	14 895	Azogrenadina sulfúrica

L

Lacmoid	51 400	Lacmoide
Lake Ponceau	16 150	Ponceau rojizo
Lanacyl Violet BF	13 375	Verde lanacil
Lapis Lazuli	77 007	Azul ultramar
Lauth's Violet	52 000	Tionina
Leather Brown	21 000	Pardo Bismarck amarillento
Leather Yellow	46 045	Fosfina
Light Blue	42 775	Azul de anilina
Light Green	42 095	Verde luz
Light Green	42 585	Verde de metilo
Light Green N	42 000	Verde malaquita
Light Green 2G, S, 2GN	42 095	Verde luz
Light Green SF, Yellowish	42 095	Verde luz
Lissamine Green B, BS	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Lissamine Red	18 055	Rojo de amidonaftol azulado
Lissamine Rhodamine B 200	45 100	Sulforodamina B
Lissamine Green V	44 025	Verde naftaleno
Litmus	51 400	Lacmoide
Luxol fast Blue G, MBS, MBSN		Azul Luxol intenso
Lyon Blue	42 775	Azul de anilina

M

Maclurin	75 240	Maclurin
Magantaroth	42 500	Pararrosanilina
Magdala Red	50 375	Rouge Magdala
Magdala Red	45 410	Floxina azulada
Magdalorot echt	50 375	Rojo Magdala
Magenta O	42 500	Pararrosanilina
Magenta I	42 510	Rosanilina
Magenta II		Dimetilfucsina
Magenta III	42 520	Neofucsina
Magenta acide	42 685	Fucsina ácida trisulfúrica
Malachite Green A, B, BX, 4B, J3E, J3ES, NB, NH, NJ	42 000	Verde malaquita
Malachite Green G	42 040	Verde brillante
Manchester Brown	21 000	Pardo Bismarck amarillento
Manchester Brown EE	21 010	Pardo Bismarck rojizo
	10 315	Amarillo de Mars
Mandarin G	15 510	Naranja II
Mandarin G	16 230	Naranja G
Mandarin G	15 510	Naranja II
Meldola Blue	51 175	Neoazul rojizo
Marshall Red	22 120	Rojo Congo
Marine Blue V	42 775	Azul de anilina
Martius Yellow	10 315	Amarillo de Mars
Mépacrine		Atebrina
Merbromin		Mercurocromo 220
Mercury Orange		Naranja de mercurio
Metachrome brilliant blue BL	17 940	Azul brillante Metacromo azulado
Metachrome Yellow 2RD	14 025	Amarillo de alizarina-amarillento
Metaméthyl Red		Rojo de metametileno
Metanil Yellow	13 065	Amarillo de metanilo
Methyl Blue	42 780	Azul de metilo
Methyl Eosin	45 385	Metileosina
Methyl Green	42 585	Verde de metilo
Methyl Orange	13 025	Naranja de metilo
Methyl Green	42 590	Verde de etilo
Methyl Red	13 020	Rojo de metilo

Methyl Violet 6B		Pentametilpa-rarrosanilina
Methyl Violet 10B	42 555	Cristal violeta
Methyl Violet, R, 2R, B, 2B, BBN, BO, V3	42 535	Violeta de metilo
Methylen Azur	52 010	Azur de metileno
Methylen Blue BX, B, BG, BB	52 015	Azur de metileno
Methylene Blue T50, T, extra	52 040	Azul de toluidina
Methylene Blue CP, TGO	52 025	Azul de tionina
Methylene Blue chloride	52 015	Azul de metileno
Methylene Blue NN, NNX	52 030	Neoazul de metileno
Methylene Blue Thiocyanate	52 015	Tiocianato de azul de metileno
Methylene Green	52 020	Verde de metileno
Methylene Violet 3RD	50 205	Violeta de metileno
Methylene Violet Bernthsen		Violeta de Bernthsen
Methylene Violet 3RAX conc.	50 206	Violeta de etileno
Michrome Black salt 296	37 245	Negro intenso azulado
Michrome Red salt 610	37 035	Rojo intenso amarillento
Michrome Black salt 601	37 190	Negro intenso K
Michrome Blue salt 250	37 235	Azul intenso azulado
Michrome Blue salt 602	37 255	Azul intenso, azul violáceo
Michrome Red salt 614	37 150	Rojo intenso LTR
Michrome Scarlet 329	37 130	Escarlata intenso rojizo
Michrome Scarlet salt 615	37 010	Escarlata intenso amarillento
Michrome Violet salt 294	37 165	Violeta intenso azulado
Millori Blue	77 510	Azul de Prusia
Milling Red B, BB, SWB	23 635	Rojo Milling azulado
Modern Violet N	51 025	Violeta moderno
Mordant Black 17	15 707	Negro cromo palatín
Mordant Orange I	14 030	Amarillo de aliza-rina rojizo
Mordant Orange 6	26 520	Naranja cromo, amarillo rojizo
Mordant Yellow PN	14 030	Amarillo de alizarina rojizo
Mordant Yellow GT	14 025	Amarillo de alizarina amarillento
Morin	75 660	Morin
M.T.T.		Metiltiazolil-di-feniltetrazolio

N

Naphtagelb S	10 316	Amarillo naftol sulfúrico
Naphtalene Pink	50 375	Rojo Magdala
Naphtalene Red	50 375	Rojo Magdala
Naphtalin Green V	44 025	Verde naftaleno
Naphtamine Blue 3BX	23 850	Azul tripán
Naphtamine Brilliant Blue 2R	23 690	Azul dianil azulado
Naphtanil Blue B	37 235	Azul intenso azulado
Naphtanil Diazo Red AL	37 275	Rojo intenso AL
α Naphtol Benzein		Alfa naftol benceína
Naphtochrome Green B, G	44 630	Verde naftocromo
Naphtol AS-AN	37 516	Naftol AS-AN
Naphtol Black 3B	27 260	Negro carbonoso amarillento
Naphtol AS-BA	37 532	Naftol AS-BA
Naphtol Blue R	51 175	Neoazul rojizo
Napthol AS-BI	37 566	Naftol AS-BI
Naphtol Blue Black	20 470	Amido negro muy azul
Naphtol AS-CL	37 531	Naftol AS-CL
Naphtol Green Y	10 005	Verde naftol amarillento
Naphtol AS-E	37 510	Naftol AS-E
Naphtol Green B	10 020	Verde naftol azulado
Naphtol AS-KB	37 526	Naftol AS-KB
Naphtol Yellow	10 315	Amarillo de Mars
Napthol AS-LC	37 555	Naftol AS-LC

α Naphtol Orange	14 600	Naranja I
α Naphtolphtalein		Alfa naftol ftaleína
Naphtol Yellow S	10 316	Amarillo naftol sulfúrico
Naphtol AS-MX	37 527	Naftol AS-MX
Naphtol Green B	10 020	Verde naftol azulado
Napthol AS Phenylpropionate		Fenil propionato de naftol AS
Naphtol Red S. C. O.	16 185	Azorrubina sulfurina
Naphtol AS-TR	37 525	Naftol AS-TR
Naphtylamine Pink	50 375	Rojo Magdala
Navy Blue RN	37 195	Azul oscuro intenso, rojizo
Narcein	15 511	Narceína II
α Naphtol Violet		Violeta de alfa naftol
α Napthyl Acetate	37 500	Acetato de alfa naftaleína
α Naphtylamine	37 265	Alfa naftil amina
Neptune Blue	42 051	Azul Neptuno
α Naphtyl Red	11 350	Rojo de naftilo
National Fast Blue BXM		Azul Nación intenso
N.B.T.		Nitro azul tetrazolium
Neptune Blue BRA	42 090	Erioglaucina
Neotetrazolium		Neoterazo-lium
Neutral Red	50 040	Rojo neutro
Neutral Acriflavine	46 000	Tripaflavina
Neutral Violet	50 030	Violeta Neutro
Neutral Trypaflavine	46 000	Tripaflavina
New Blue R	51 175	Neoazul rojizo
New Fuchsin	42 520	Neofucsina
New Magenta	42 520	Neofucsina
New Methylene Blue H	52 025	Azul de tionina
New Methylene Blue N	52 030	Neoazul de metileno
New Pink	45 405	Floxina
New Ponceau 4R	16 150	Ponceau rojizo
New Victoria Blue B, R	44 090	Azul Victoria rojizo
New Victoria Green extra	42 000	Verde *O, I, H* malaquita
Niagara Blue 3B	23 850	Azul tripán
Niagara Blue 4B	24 400	Azul celeste Benzo
Niagara Blue 6B	24 410	Azul Chicago muy intenso
Night Blue	44 085	Azul noche
Night Blue R	51 175	Neoazul rojizo
Nigrosin alcohol soluble	50 415	Nigrosín
Nigrosin water soluble	50 420	Nigrosín sulfúrica
Nile Blue A	51 180	Azul Nilo
Nile Blue 2B	51 185	Azul Nilo azulado
Nile Blue sulfate	51 180	Azul Nilo
Nitramine		Nitroamina
Nitrazine	14 890	Amarillo de nitrazol
Nitrazol CF	14 890	Amarillo de nitrazol
Nitrazin Yellow	14 890	Amarillo de nitrazol
Nitrazol Yellow	37 035	Rojo intenso amarillento
Nitrosamine Red		Azul nitrado de tetrazolium
Nitro-BT	37 035	Rojo intenso amarillento
Nitro Blue Tetrazolium		Azul nitrado de tetrazolium
Nitrophénol		Nitrofenol
Noir Amido 10B	20 470	Azul negro naftol
Noir Cérès	26 150	Negro Sudán azulado
Nopalin G	26 150	Negro Sudán azulado
Nubian Yellow TB	45 400	Eosina azulada
Nuclear Fast Red		Neotetrazo-lium
Nuclear Fast Red	11 350	Rojo naftilo
Noir Cérol	60 760	Rubina helioestable

O

o-Crésolbenzein		Ortocresol-benceína
Oil Blue N, NA	61 555	Azul liposoluble
Oil Brown D	12 020	Pardo Sudán azulado
Oil Brown Y	20 020	Pardo liposoluble amarillento
Oil Orange 2311,	12 055	Naranja

E, EP, G, P		Sudán rojizo
Oil Orange G, 4G, MO, MON	11 920	Naranja Sudán amarillento
Oil Red AS, O, B, 3B	26 100	Sudán III
Oil Red 4B	26 105	Rojo Sudán azul intenso
Oil Red EGN, OB, N-1700	26 120	Rojo liposoluble EGN
Oil Red O	26 125	Rojo liposoluble anaranjado
Oil Red IV	26 105	Sudán IV
Oil Scarlet	12 140	Sudán II
Oil Vermillon	12 150	Rojo Sudán amarillento
Oil Yellow	11 920	Naranja Sudán amarillento
Oil Yellow II	11 020	Amarillo liposoluble
Oil Yellow A, AB, AN, R	11 000	Amarillo de anilina
Oil Yellow AT, B, C, R, RR, T, TT	11 160	Amarillo liposoluble azulado
Oil Yellow II	11 020	Amarillo liposoluble
Oil Vermillon	12 150	Rojo Sudán amarillento
Orange G, GG	16 230	Naranja G
Orange G, GR, R	26 520	Naranja cromo, amarillento rojizo
Orange acid II	16 230	Naranja II
Orange A, P, R	15 510	Naranja II
Orange MN, MNO	13 065	Amarillo de metanilo
Orange extra	15 510	Naranja II
Orange GRS, II, B	37 025	Naranja intenso, amarillento rojizo
Orange N	13 080	Naranja IV
Orange R	14 030	Amarillo de alizarina rojizo
Orange RR	12 140	Sudán II
Orange S		Naranja S
Orange III	13 025	Naranja de metilo
Orcein		Orceína
Orseillin BB	26 670	Orseillina azulada

P

Palatine Chrome Black 6BN	15 705	Negro cromo palatin
Paper Yellow	24 890	Amarillo brillante
Parafuchsin	42 500	Pararrosanilina
Paramagenta	42 500	Pararrosanilina
Paraméthyl Red		Rojo de parametilo
Paranitraniline Red	37 035	Rojo intenso amarillento
Para Red	37 035	Rojo intenso amarillento
Pararrosanilin	42 500	Pararrosanilina
Pararosolic acid	43 800	Ácido pararrosólico
Paris Blue	42 775	Azul de anilina
Paris Blue	77 510	Azul de Prusia
Paris Violet	42 535	Violeta de metilo
Patent Blue	42 045	Azul patente
Patent Blue AE	42 090	Erioglaucina
Patent Blue A	42 080	Alfazurina
Patent Blue V	42 051	Azul Neptuno
Patent Blue AB	42 576	Violeta de formilo
Patent Blue AE	42 090	Erioglaucina
Patent Blue VF	42 045	Azul patente
Pentamethoxy Red		Rojo pentameto-xilo
Permanent Orange R	15 520	Naranja permanente rojizo
Permanent Red R	12 085	Rojo permanente
Phenacetolin		Fenacetolina
Phenazine methosulfate		Monosulfato de fenacina
Phenol Red		Fenolsufonado fetaleína
Phenylene Brown	21 000	Pardo Bismarck amarillento
Phenosafranine	50 200	Fenosafranina
Phenylene Blue	51 175	Neoazul rojizo
Phenylrosinduline		Fenilrosindulina
Phloxine B, TA, N, BP super, NB, TB, BB	45 410	Floxina azulada
Phloxine	45 405	Floxina
Pigment Red 4	12 085	Rojo permanente
Phoenix Brown	21 030	Pardo Phoenix rojizo

Poirrier Blue C4B	42 780	Azul de metileno
Phosphine	46 045	Fosfina
Ponceau B	26 905	Escarlata
Picric acid	10 305	Ácido pícrico
Pinachrome		Pinacromo
Pinacyanol		Pinacianol
Ponceau 6R	16 250	Cristal Ponceau rojo intenso
Ponceau R, RG, G, 4R, 2RE, NR, J, FR, GR	16 150	Ponceau rojizo
Ponceau 9R	16 155	Ponceau GR 11
Ponceau S	27 195	Ponceau azulado
Ponceau cristallisé	16 250	Cristal Ponceau rojo intenso
Ponceau de Xylidine	16 150	Ponceau rojizo
Pontacyl acid Violet	13 375	Violeta lanacilo, azulado pálido
Pontacyl Blue Black SX	20 470	Amido negro muy azul
Pontacyl Brilliant Blue	42 051	Azul Neptuno
Pontacyl Green B	42 085	Verde Guinea
Pontacyl Green S	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Pontacyl Green V	44 025	Verde naftaleno
Pontacyl Violet 4 BL	42 576	Violeta de formilo
Pontamine Black E, EX, EXX	30 235	Negro de clorazol
Pontamine Black RRX	30 245	Negro directo profundo
Pontamine fast Black PG, PGR	35 435	Cotonerol
Pontamine fast Red 7BNL	35 780	Rojo Sirius azulado
Pontamine Sky Blue 5BX	24 400	Azul celeste benzo
Pontamine Sky Blue 6BX	24 410	Azul Chicago muy intenso
Pontamine Violet N	22 570	Violeta benzo intenso
Pourpre d'Éthyle 6B	42 600	Violeta de etilo
Primula R water soluble	42 530	Violeta Hofmann
Primulin	49 000	Primulina
Primuline Yellow	49 000	Primulina
Prontosil Red		Prontosil
Proflavine	46 000	Acriflavina
Propyl α Naphtol Orange		Propilalfanaftol anaranjado
Propyl Red		Rojo de propilo
Protargol		Proteinato de plata
Prune pure	51 040	Azul Gallo
Prussian Blue	77 510	Azul de Prusia
Pseudo isocyanin diethyl		Dietil seudoisocianina
Pure Blue	24 400	Azul cielo benzo
Pure Blue B	43 830	Azul cromoxane
Pure Blue 6B	24 410	Azul Chicago muy intenso
Pure Blue V	42 051	Azul patente
Purpurin	58 205	Purpurina
Pyoktamine	42 535	Violeta de metilo
Pyoktaminum Coeruleum	42 535	Violeta de metilo
Pyrogallol Phtaléine	45 455	Galleína
Pyronine B	45 010	Pironina azulada
Pyronine Y, G	45 005	Pironina amarillenta
Pyronin B	45 430	Eritrosina azulada
Pyrosin J	45 425	Eritrosina amarillenta
Pyrrol Blue	42 700	Azul pirrol, isamina

Q

Quinacrine		Atebrina
Quinaldine Red		Rojo de quinaldina
Quinalizarin	58 500	Quinalizarina
Quinalizarin sulfonic acid	58 055	Ácido rufiánico
Quinoline Blue		Azul de quinolina
Quinoline Yellow A	47 000	Amarillo de quinolina A
Quinoline Yellow H	47 015	Amarillo de quinolina H
Quinoline Yellow PN	47 010	Amarillo de quinolina rosado
Quinoline Yellow S	47 005	Amarillo de quinolina sulfúrico
Quinolinol		Quinolinol

R

Red AL, ALS	37 275	Rojo intenso AL

Red B	12 140	Sudán II
Red B, 5B, 8B	35 780	Rojo Sirius azulado
Red B, 4B, 9B	28 160	Rojo Sirius azul intenso
Red B	37 125	Rojo intenso azulado
Red B	18 760	Rojo eriocromo azulado
Red GG, 2GS	37 035	Rojo intenso amarillento
Red 3G, 3GK, F	37 040	Rojo intenso amarillo
Red ITR	37 150	Rojo intenso LTR
Red TR, TA, TRS, IX	37 085	Rojo intenso rojizo
Red RL	37 100	Rojo intenso débil
Red base X	37 100	Rojo intenso débil
Red Cinnabar	77 766	Bermellón
Red Corallin		Coralina roja
Red Mercuric sulfide	77 766	Bermellón
Red salt base V	37 125	Rojo intenso azulado
Red salt VI	37 040	Rojo intenso amarillento
Red Violet LB		Violeta rojo intenso
Red Violet	42 530	Violeta Hofmann
Renol Black G	30 235	Negro de clorazol
Resorcin Blue	51 020	Azul de resorcina
Résorcinol Blue		Azul de resorcinol
Résorcinol Yellow	14 270	Tropeolina anaranjada
Rezazurin		Resazurina
Rhodindine	50 375	Rojo Magdala
Resorufin		Resorufina
Rheonine A, AL, G, N	46 075	Reonina
Rivanol		Rivanol
Rhodamine 6G, 6GX, 6GDN	45 160	Rodamina muy amarillenta
Rhodamine S	45 050	Rodamina
Rhodamine 3G	45 210	Rodamina amarillenta
Rhodamine O, B	45 170	Rodamina azulada
Rhodulin Orange NO	46 005	Naranja de acridina
Rhodine 12GM	44 310	Rodamina 3G
Roccellin G, K, L, S	15 620	Rocelina
Rosazine	50 085	Azocarmín amarillento
Rosaniline	42 510	Monometil pararrosanilina
Rose Bengal extra 3B conc.	45 440	Rosa Bengala
Rosinduline GXF	50 085	Azocarmín amarillento
Rosolic acid	43 800	Ácido rosólico
Rosophénine 10B	14 780	Rojo tiazino rojizo
Rouge Amidonaphtol G	18 050	Azofloxina
Rouge Cérasine	26 100	Sudán III
Rouge d'Aniline	42 510	Rosanilina
Rouge de Naphtylamine	50 375b	Rojo Magdala
Rouge de Toluylène	50 040	Rojo neutro
Rouge de Naphthalène	50 375b	Rojo Magdala
Rouge Nucléaire intense		Rojo nuclear (para calcio)
Rubiazol		Prontosil
Rubin M, R, 2R	14 720	Cromotropo FB
Rubin S	42 685	Rosanilina ácida trisulfúrica
Rubeanic acid		Ácido rubeánico
Rubine acide	42 685	Rosanilina ácida trisulfúrica
Rufianic acid	58 055	Ácido rufiánico
Ruthenium Red		Rojo de rutenio

S

Saffron	75 100	Safrán
Saffrosin	45 400	Eosina azulada
Safranin 6B, 8B	50 205	Violeta de metileno
Safranine B extra	50 200	Fenosafranina
Safranine O, T, AG, MP, G	50 240	Safranina
Salicin Black EAG	16 110	Negro Salicina
Salicin Black D	26 695	Negro diamante oscuro
Salicyl Yellow	14 025	Amarillo de alizarina amarillento
Scarlach R	26 105	Sudán IV
Scarlet B, EC, 3B	26 905	Escarlata de Biebrich
Scarlet 2G, A. I	37 010	Escarlata intenso amarillento

Scarlet R	16 150	Ponceau rubescente
Scarlet 6R	16 250	Cristal Ponceau, rojo intenso
Scarlet R, RS, RC, NSR, III	37 130	Escarlata intenso rojizo
Scarlet B fast soluble	26 100	Sudán III
Scarlet Red	26 105	Sudán IV
Sel Brun R	11 270	Crisoidina amarillenta
Sensitol Red		Pinacianol
Sequestrene		Ácido etileno Diamina tetracética
Silver Proteinate		Proteinato de plata
Sirius Pink 4BL	25 380	Rosa Sirius azulado
Sirius Light Blue GL	23 160	Azul Sirius amarillento
Sirius Red F3B	35 780	Rojo Sirius azulado
Sirius Red 4B	28 160	Rojo Sirius muy azulado
Sirius Rose BB	25 380	Rosa Sirius azulado
Sirius supra Blue GL	23 160	Azul Sirius amarillento
Sky Blue	24 400	Azul celeste benzo
Sky Blue	77 368	Azul cobalto
Sky Blue 6B	24 410	Azul Chicago muy intenso
Solamine Light Blue GL	23 160	Azul Sirius amarillento
Solantine Red 8BL	28 160	Rojo Sirius muy azul
Solantine Red 8 BLN	35 780	Rojo Sirius azulado
Solid Green O	42 000	Verde malaquita
Solid Green JJO	42 040	Verde brillante
Solochrome Cyanine R	43 820	Cianina de cromo
Solochrome Violet RS	15 670	Violeta ácido de alizarina
Soluble Blue 3M, 2R	42 775	Azul de anilina
Solvent Orange 7	12 140	Sudán II
Solvent Orange 30	20 020	Pardo liposoluble amarillento
Solvent Red 23	26 100	Sudán III
Solvent Red 7B	26 050	Rojo Sudán azul intenso
Solvent Red 24	26 105	Sudán IV
Solvent Yellow 16	12 700	Amarillo Sudán amarillento
Solvent Yellow 14	12 055	Naranja Sudán rojizo
Sorbine Red	14 895	Azogrenadina sulfúrica
Soudan Orange G	11 920	Naranja Sudán amarillento
Spirit Blue	42 775	Azul de anilina
Spirit Nigrosin R	50 400	Indulina
Steel Blue	77 510	Azul de Prusia
Sudan	26 100	Sudán III
Sudan II	12 140	Sudán II
Sudan G	26 100	Sudán III
Sudan R	12 150	Rojo Sudán amarillento
Sudan Black B	26 150	Negro Sudán azulado
Sudan Blue		Azul Sudán
Sudan Blue G	61 525	Azul Sudán amarillento
Sudan Blue GN	61 520	Neoazul Sudán amarillento
Sudan Blue II		Azul BASF
Sudán Brown BB, AN	12 020	Pardo Sudán azulado
Sudan Green BB	62 545	Verde Sudán azulado
Sudan Orange RR	12 140	Sudán II
Sudan Red G	12 150	Rojo Sudán amarillento
Sudan Red	50 375	Rojo Magdala
Sudan Red BK	26 100	Sudán III
Sudan Red B	26 110	Rojo Sudán azulado
Sudan Red 4B, 4BA	26 105	Rojo Sudán azul intenso
Sudan Violet R	61 100	Violeta Sudán
Sudan Yellow 3G	12 700	Amarillo Sudán amarillento
Sudan Yellow	12 055	Naranja Sudán rojizo
Sudan Yellow RRA	11 160	Granate intenso GBC
Sudan Yellow GG	11 020	Amarillo liposoluble
Sudan Yellow R	11 000	Amarillo de anilina
Sulfone acid Blue R	13 390	Azul ácido sulfúrico rojizo
Sulforhodamine B	45 100	Sulforodamina
Sultan 4B	23 500	Benzopurpurina muy azul

Superchrome Blue B	15 705	Negro cromado palatino
Superchrome Black T	14 645	Negro cromógeno
Superchrome Red B	16 105	Rojo ácido de alizarina azulado
Suprazo Blue 2GL	23 160	Azul Sirius amarillento
Swiss Blue	52 015	Azul de metileno

T

Tartrazin O	19 140	Tartracina
TC-NBT		Tiocarbamida nitroazul de tetrazolium
Tetracid Brilliant Black B	27 260	Negro carbonoso amarillento
Tetrazolium Violet		Violeta de tetrazolium
Thiazine Red R	14 780	Rojo tiazina rojizo
Thiazol Yellow G	19 540	Amarillo de tiazol
Thioflavine S	49 010	Metil primulina
Thioflavine T, G	49 005	Tioflavina
Thionin Blue GO, J	52 025	Azul de tionina
Thymol Blue		Timol sulfonado
		Eftaleína
Titan Yellow	19 540	Amarillo tiazol
Toluidin Blue O	52 040	Azul de toluidina
Toluylene Blue	49 410	Azul de toluilene
Toluylene Red	50 040	Rojo neutro
Trinitrophénol	10 305	Ácido pícrico
Tropaeolin D	13 025	Naranja de metilo
Tropaeolin G, OOO n.º 1	14 600	Naranja I
Tropaeolin O	14 270	Tropeolina anaranjada
Tropaeolin OO	13 080	Naranja IV
Tropaeolin OOO, n.º 2	15 510	Naranja II
Tropaeolin Y	14 270	Trapeolín anaranjado
TTC, CTT		Cloruro de trifeniltetrazolio
Tuchechtgelb	13 015	Amarillo sólido
Turnbull's Blue	77 525	Azul de Turnbull
Turmeric	75 300	Curcumina
T.V., VT		Violeta de tetrazolio
Trypaflavine	46 000	Acriflavina
Trypan Blue	23 850	Azul tripán
Trypan Red	22 850	Rojo tripán

U

Ultramarine Blue	77 007	Azul ultramar
Ultraviolet RS	43 810	Violeta de cromo
Union Green B	11 050	Verde Janus azulado
Unki	75 100	Azafrán
Uranine	45 350	Fluoresceína
Usually Blue 2B	22 610	Azul benzo azulado

V

Variamine Blue B, BA, BD, BN	37 255	Azul intenso azul violeta
Vermilleon	77 766	Bermellón
Versène		Ácido de etileno diaminotetra-acético
Vert acide	42 095	Verde luz
Vert d'Alsace	10 020	Verde naftol azulado
Vert d'Éthyle	42 040	Verde brillante
Vert Diamant G	42 040	Verde brillante
Vert Diazine	11 045	Verde Janus azulado
Vert double SF	42 485	Verde luz
Vert Émeraude	42 040	Verde brillante
Vert Lissamine	56 205	Verde lanoso
Vert Lumière N	42 000	Verde malaquita
Vert Lumière	42 585	Verde luz
Vert Malachite G	42 040	Verde brillante
Vert Solide O	42 000	Verde malaquita
Vert solide JJO	42 040	Verde brillante
Vert Victoria B	42 000	Verde malaquita
Vesuvin	21 000	Pardo Bismarck amarillento
Vesuvin NR, R, BL new	21 010	Pardo Bismarck rojizo
Victoria Blue B	44 045	Azul Victoria azulado

Victoria Blue R	44 040	Azul Victoria rojizo
Victoria Blue 4R	42 563	Azul Victoria muy rojo
Victoria Green B, WB	42 000	Verde malaquita
Victoria Green G		Verde Victoria amarillento
Victoria Rubin O	16 185	Azorrubina sulfúrica
Victoria Scarlet 3R	16 255	Escarlata Victoria azulada rojiza
Violamine R	45 190	Violeta ácido intenso rojizo
Violamine 3B	45 205	Azul ácido intenso rojizo
Violet B, N	15 670	Violeta ácido de alizarina
Violet B, BN	37 165	Violeta intenso azulado
Violet C, G, 7B	42 555	Cristal violeta
Violet N, R	22 570	Benzo Violeta intenso
Violet R, RR, 4RN, RRN	42 530	Violeta Hofmann
Violet Dahlia	42 530	Violeta Hofmann
Violet de Gentiane	42 555	Cristal violeta
Violet de Gentiane	42 535	Violeta de metilo
Violet Hexamethylé	42 555	Cristal violeta
Violet d'Iode	42 530	Violeta de Hofmann
Violet de Lauth	52 000	Tionina
Violet de Méthyle 10B	42 555	Cristal violeta
Violet de Paris	42 535	Violeta de metilo
Vital new Red		Rojo vital nuevo
Vital Red	23 570	Rojo vital

W

Water Blue I	42 755	Azul de anilina
Wongshy	75 100	Azafrán
Woodstain Scarlet	27 290	Croceína brillante
Wool Green S, BS, BSNA, C	44 090	Verde lanoso sulfúrico
Wool Orange 2G, GMP	16 230	Naranja amarillenta
Wool Red	16 185	Amaranta
Wool Red 10B	16 600	Rojo lanoso muy azulado

X

Xanthine	46 045	Fosfina
Xylene Blue VS	42 045	Azul patente
Xylene Cyanol FF	43 535	Cianol
Xylenol Blue		Azul de xilenol
Xylidine Ponceau 3RS	16 150	Ponceau rojizo

Y

Yellow T	19 140	Tartracina
Yellow WR	13 085	Amarillo brillante sulfúrico
Yellow Corallin	43 800	Aurina

Z

Zinco		Zincón Proformazón

4/
TINCIONES E IMPREGNACIONES

I. — METODOLOGÍA

GENERALIDADES

Hace relativamente poco que los histólogos han tenido que admitir que la tinción de las células es el resultado de un conjunto de fenómenos fisicoquímicos muy complejos. Algunas reacciones tintoriales son reversibles, otras por el contrario no lo son; algunos colorantes que han teñido en exceso pueden eliminarse con disolventes adecuados, otros tiñen con un color distinto al suyo, otros únicamente tiñen cuando se combinan con determinadas estructuras, mientras que otros sólo tiñen en presencia de una sal metálica y otros son muy sensibles al pH. Todas estas observaciones de tipo experimental, llevadas a cabo desde hace mucho tiempo, sirvieron de base para hacer una primera ordenación de los mecanismos de coloraciones o tinciones.

Dado que este Manual no pretende ser un tratado de histoquímica, se clasificarán las técnicas de tinción atendiendo únicamente al punto de vista práctico.

Coloraciones topográficas: son las que diferencian mejor los distintos tejidos que integran un órgano y permiten visualizar todos los componentes, inclusive los núcleos.

Tinciones histológicas: son las que diferencian con gran precisión todos los elementos tisulares, tanto las estructuras más delicadas como sus exudados o secreciones. Una tinción de este tipo se considera histoquímica cuando tiñe específicamente un determinado compuesto.

Tinciones citológicas: son las que permiten identificar las estructuras internas de las células. Dichas coloraciones pueden ser citoquímicas y ponen de manifiesto determinadas reacciones químicas.

Tinciones estructurales: ponen de manifiesto los componentes de algunas estructuras tisulares independientemente del propio tejido: fibras elásticas, fibras reticulares, xilema lignificado, estructuras queratinizadas, quitinizadas o esclerificadas, etc.

Tinciones ultraestructurales, es más correcto hablar de contrastado: tienen por función la de poner de manifiesto detalles ultraestructurales al microscopio electrónico.

Tinciones directas: se fijan directamente sobre las estructuras.

Tinciones lipocrómicas: se fijan o, mejor dicho, se depositan, directamente sobre los aceites, grasas y ceras.

Tinciones progresivas: controlándolas al microscopio se frena el proceso tintorial en el momento en que se considera que las estructuras han quedado suficientemente teñidas.

Tinciones regresivas: después de haber provocado una sobretinción voluntaria debe diferenciarse mediante un reactivo que va eliminando progresivamente el exceso de colorante; generalmente debe vigilarse al microscopio para detener este «desteñido» en el momento oportuno.

Tinciones indirectas con la actuación de mordientes: la fijación del colorante sobre las estructuras se lleva a cabo por mediación de un agente intermediario, generalmente una sal metálica «mordiente». El mordiente puede formar parte del fijador, con lo que éste actúa como tal a la vez que juega el papel de mordiente, o bien puede utilizarse antes de la aplicación del colorante o simultáneamente con éste.

Tinciones en bloque: generalmente se aplica tras la fijación del material previa inclusión.

Tinciones sobre portaobjetos: frotis, disociaciones y cortes.

Tinción por infiltración: tras anestesiar previamente el organismo se inyecta el colorante por vía sanguínea o bien en la cavidad general del cuerpo o en los vasos conductores, si se trata de vegetales.

Inyección o perfusión de una masa tintorial en las cavidades naturales de un organismo. Se practica cuando se pretende poner en evidencia, tras disolver la materia orgánica, el sistema arteriovenoso, los bronquios y bronquiolos, etc.

OBSERVACIONES

No existe una fórmula general que sea válida para todos los materiales y estructuras. Un buen microscopista es aquel a quien una larga expe-

riencia le ha permitido variar los tiempos y las concentraciones de las soluciones tintoriales, el sustituir un colorante por otro para obtener mejor resultado. Estas variaciones están en función de una serie de factores, entre los cuales cabe destacar: el fijador empleado, el tipo de material que se estudia, el grosor de los cortes obtenidos, la estructura que se pretende observar de forma preferente; asimismo depende del colorante utilizado: su marca, así como el tiempo que lleva preparado influyen en los resultados, así como la temperatura en que se trabaja, etc.

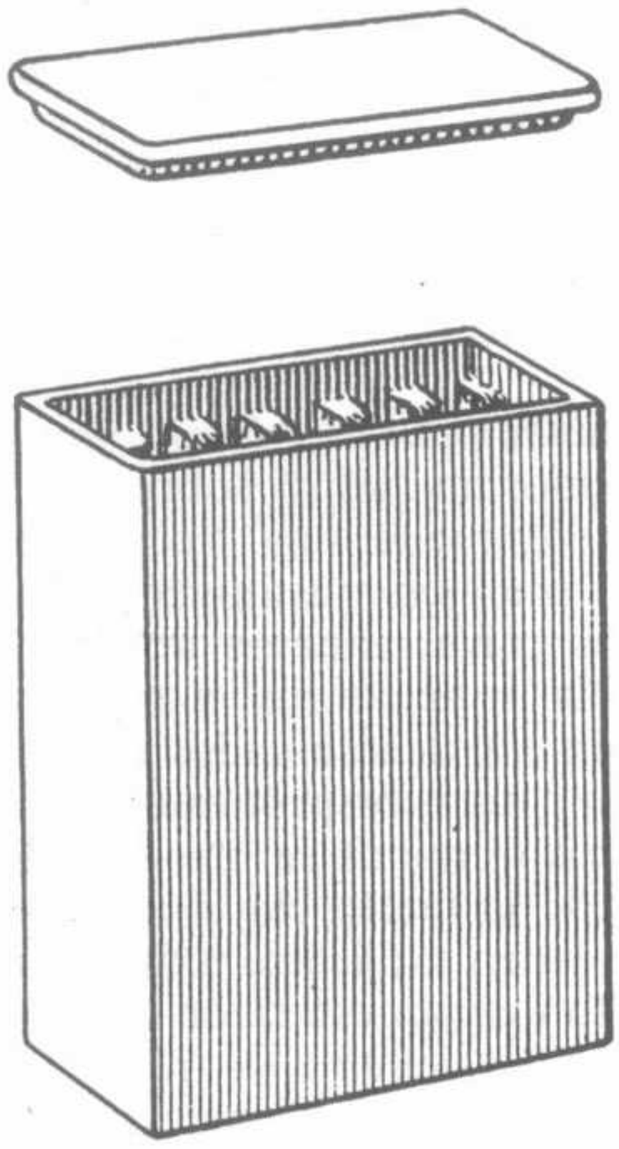


FIG. 149. — *Cubeta de tinción de porcelana, con ranuras internas.* Documento Prolabo, París.

Siempre deben conservarse los colorantes en sus frascos de origen, a ser posible en sitio fresco, a la oscuridad, siempre deben estar herméticamente cerrados y en un sitio en el que no se guarden productos de tipo volátil: ácidos o disolventes.

Únicamente se emplearán una sola vez los utensilios que permiten coger los reactivos tintoriales a fin de pesarlos y preparar las disoluciones convenientes. Seguidamente, dichos instrumentos serán cuidadosamente lavados antes de emplearlos de nuevo. Es sumamente práctico trabajar con tiras de papel o cartón que se desechan después de cada uso.

Cuando se trabaja con cajas a ranuras para hacer las tinciones deberá tomarse la precaución de escurrir bien los portaobjetos antes de pasarlos a otra caja, a fin de contaminar lo mínimo posible los reactivos. Los colorantes deberán renovarse frecuentemente.

Los lavados serán efectuados con agua corriente o bien renovada frecuentemente o bien con agua destilada, depende del tipo de colorante utilizado; no debe pretenderse acortar el tiempo de los lavados.

Si deben teñirse simultáneamente varias preparaciones se utilizarán las cubetas verticales de tinción (figs. 149 y 150) o cuando se trabaja horizontalmente las cajas de Laveran (fig. 151).

Para observar la marcha de la tinción bien sea progresiva o regresiva es conveniente disponer de un viejo microscopio a fin de evitar deteriorarlo con los productos tintoriales o corrosivos que suelen emplearse.

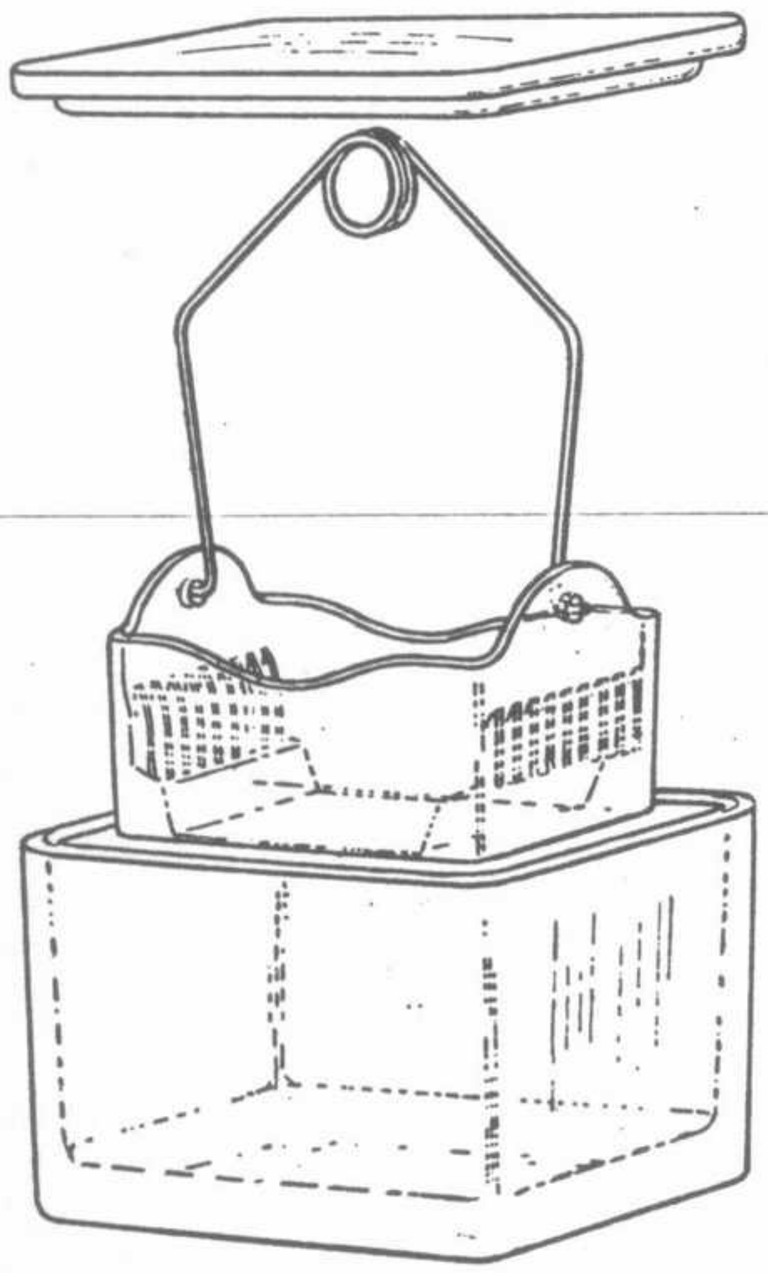


FIG. 150. — *Cubeta de coloración con su cestilla de vidrio; ésta permite el transporte de los portaobjetos en cubetas sucesivas con un mínimo de manipulaciones (habitualmente se denominan cunitas).* Documento Prolabo, París.

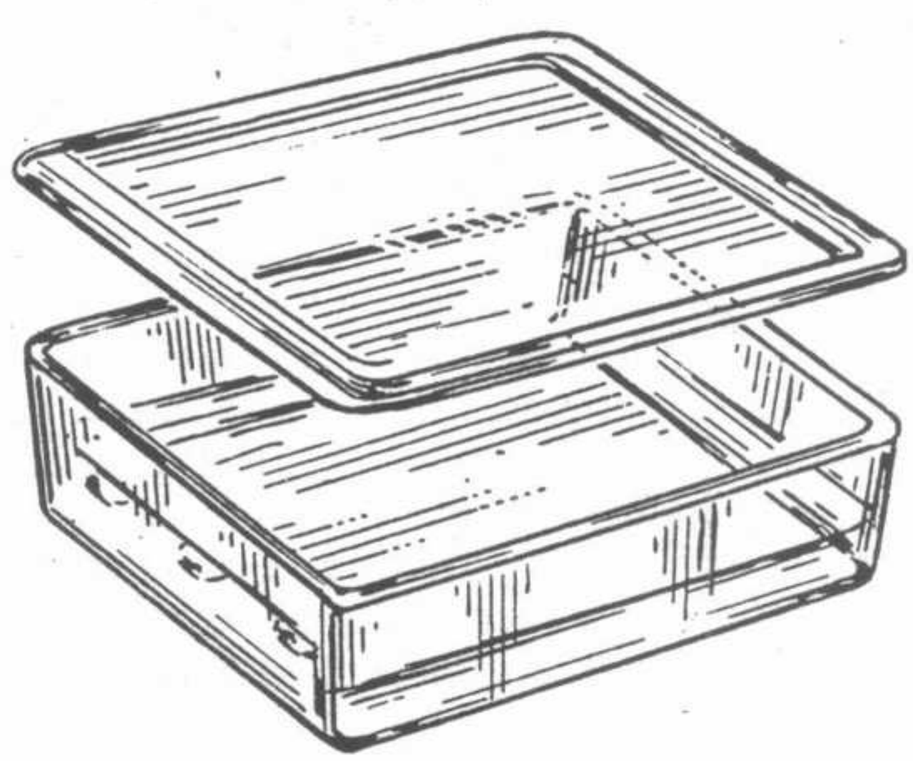


FIG. 151. — *Caja de Laveran, de vidrio, para tinción de portaobjetos en posición horizontal; en el fondo se instala una varilla de vidrio en forma de U para poder colocar encima los portaobjetos.* Documento Prolabo, París.

MATERIAS COLORANTES

Son sustancias que se depositan de forma adecuada sobre las estructuras con las que contactan por mediación de una solución tintorial.

El color resultante está relacionado con la absorción selectiva de algunas bandas del conjunto del espectro visible.

Existen en el comercio unos 2000 tipos de productos químicos que tiene propiedades tintoriales y hay unos 25 000 nombres o marcas para designarlos de forma más o menos fantástica. Nuestro repertorio de sinónimos (p. 194) intenta, hasta cierto punto, clarificar la composición química de 2500 de ellos. Si el científico admite con dificultad el hecho de que se pueda engañar al comprador vendiéndole el mismo producto detergente bajo diez marcas distintas, o que se oculte al consumidor la naturaleza química de los aditivos de los productos que consume, poniéndoles un código imposible de memorizar, protesta enérgicamente contra tales prácticas en el campo de los colorantes que son fuente de problemas sin fin. Nunca dejaremos de quejarnos enérgicamente de que todos los fabricantes continúen produciendo y vendiendo el mismo colorante bajo dos o más denominaciones distintas, y sin indicar su composición química, y ello generalmente para evitar la pérdida de posibles compradores encariñados con las denominaciones antiguas (de mayor solera). A toda costa pretenden diferenciarse de los competidores titulando los colorantes sin ninguna lógica aparente, nombres fantasiosos que generalmente nunca van acompañados por la fórmula química del producto inscrita en la etiqueta. Así, si consideramos un reactivo como el ácido clorhídrico, éste podría ser vendido por el mismo fabricante bajo el nombre de «espíritu de sal» o bien como «solución ácida de San Fons», sin ninguna referencia del ClH. Otros fabricantes escribirían en sus etiquetas «ácido de San Fons Y o 6Y» y el carácter chauvinista pondría su granito de arena al adicionar o crear la denominación «Napoleón brillante» o una «Sal de El Alamein».

Para intentar salir de esta situación más propia de la Edad Media hemos utilizado en nuestro texto las denominaciones de los colorantes seleccionados que hemos creído más adecuados, evitando las sinonimias. En nuestro índice general no figuran las sinonimias. Si el lector no encuentra en este índice el nombre que busca debe remitirse a la página 194 para establecer la correspondencia con el nombre legítimo del colorante en cuestión utilizado en nuestro Manual.

MODALIDADES

Las tinciones o coloraciones pueden subdivirse de la siguiente manera:

- — reacciones citoquímicas entre colorante y estructura;
- — inhibición diferencial del material;
- — precipitación del colorante sobre la estructura:
- — absorción del colorante por la estructura;
- — unión con la estructura a través de un «mordiente»;
- — reacción con la estructura;
- — devolver la pigmentación a un «leucoderivado»;
- — ultrafiltración.

Reacciones tintoriales de tipo químico. — A Ehrlich debemos una teoría sobre la reacción química que presupone una tinción, enunciada en 1879. Sus trabajos constituyen la base y origen de conceptos universalmente utilizados tales como la basofilia, la acidofilia, la anfoteridad, relacionados con los denominados colorantes básicos, ácidos o neutros, respectivamente.

De estos términos se hizo una generalización excesiva de la interpretación de los mismos, ya que no pueden explicarse todas las reacciones en base a ello y es por esa razón que los investigadores de los años veinte a los treinta de este siglo se inclinaron por negar sistemáticamente el valor de estos términos, cayendo lógicamente en un extremismo tan erróneo como el primero. Actualmente se reconoce una parte de autenticidad en ambas teorías o posturas.

En la actualidad, nadie se atrevería a negar la importancia de la teoría química. Hay suficientes datos para apoyarla totalmente. Ningún histólogo renunciaría actualmente a poder emplear los conceptos de basicidad o acidez de los colorantes o bien a negar la reducción producida por determinados tejidos sobre ciertos compuestos argénticos.

Imbibición diferencial con competición. — Algunos colorantes de naturaleza ácida se fijan de forma diferente sobre ciertas estructuras, lo que provoca tinciones selectivas, aunque no específicas, por imbibición a velocidades distintas; además cabe señalar que el primer colorante al ocupar un «espacio» afín impide el acceso de otros colorantes que actuarían conjuntamente. En este principio se basan varias técnicas tintoriales triácidas o tricrómicas competitivas (cf. p. 250).

Precipitación del colorante sobre el material. — Seleccionemos un ejemplo: la actividad reductora de un tejido conduce a la formación, en las condiciones de trabajo, de azul de Prusia. Este colorante es insoluble y precipita a modo de sustancia amorfa o microgranulosa que es atraída electrostáticamente por ciertas estructuras. Se lleva a cabo una tinción por «precipitación-adsorción superficial». Este tipo de coloración es

inmejorable, sin embargo no debe generalizarse al extremo que lo ha hecho Möllendorff (1923-1924), ya que hay otra gama de posibilidades tintoriales.

Adsorción de un colorante. — Inicialmente planteada a raíz de las teorías coloidales y por consiguiente relacionándola con las fuerzas electrostáticas que rodean las macromoléculas, esta teoría se manifiesta francamente válida y llena de posibilidades para explicar determinadas tinciones que evolucionan rápidamente en función del pH. Pischinger (1926-27) ha demostrado que si bien determinadas proteínas pueden manifestarse como básicas o ácidas, según los casos, es debido a que su carácter anfótero se manifestaría en signo contrario, según el colorante actuara a un lado u otro de su punto isoeléctrico. Es indudablemente una manifestación del carácter electrostático de las sustancias, las fuerzas de Van der Waals son insensibles al pH. Su radio de acción, de unos 100 Å, es mucho mayor. Las cargas negativas o positivas de las estructuras se hallan íntimamente unidas a las propiedades químicas de los cuerpos presentes, la teoría electrostática se complementa con la teoría química.

Unión a la estructura mediante un mordiente. — Tinciones indirectas, con la formación de lacas.

Algunos colorantes sólo se depositan sobre determinadas estructuras cuando éstas han sido sometidas a la acción de un «mordiente». Se trata de un fenómeno ampliamente conocido por los curtidores y que se ha introducido en la técnica histológica. El mordiente actúa independientemente, es decir, en solitario o bien conjuntamente con la solución tintorial, siendo éste el caso más frecuente, denominándose «laca» (combinación del colorante más el mordiente).

Estas lacas se utilizan bien sea para una tinción «progresiva», que frenamos en el momento en que se ha conseguido una intensidad deseada, o bien actúan como tinción «regresiva» y debe eliminarse el exceso de tinción provocado por el colorante-mordiente-estructura, haciendo actuar una solución diferenciadora.

Impedimento de la unión con la estructura. — Los dos ácidos: fosfomolíbdico y fosfotúngstico tienen en común la propiedad de impedir que ciertos colorante se depositen sobre determinadas estructuras. Actúan de forma opuesta a los mordientes anteriormente considerados, se trata de «mordientes negativos».

Pigmentación de un leucoderivado. — Se trata evidentemente de una reacción química, pero mientras que ésta generalmente se lleva a cabo con un compuesto que inicialmente tiene color, en este caso hay una asociación entre la estructura y la solución aplicada que es un «colorante incoloro» o «leucoderivado», de manera que se produce una modificación química, tal es la manera de actuar de la pararrosanilina. El producto de partida que dio lugar al leucoderivado y el producto final, pigmentado, son diferentes, no hay regeneración.

Ultrafiltración. — Algunos colorantes como el yodo, determinadas sales de mercurio y diversos colorantes orgánicos metacromáticos tienen la propiedad de estar formados por agregados de moléculas de distintos componentes, atendiendo a sus dimensiones. El paso de estos colorantes a través de ciertas estructuras y sobre todo de gruesas cubiertas provoca una estratificación de estos agregados atendiendo a sus dimensiones. El resultado es la obtención de variadas tinciones orto o metacromáticas.

COLORANTES NEUTROS

Son mezclas bi, tri o cuatripartitas de colorantes, cada uno de los cuales posee un cromóforo. El calificativo, hasta cierto punto abusivo de «neutro» se debe a que inicialmente se obtuvieron mezclando un colorante de naturaleza ácida con otro de tipo básico. Generalmente es el histólogo el que obtiene las mezclas deseadas, sin embargo algunos colorantes neutros pueden adquirirse ya preparados en el comercio.

El colorante triácido de Ehrlich (1910) es una mezcla de fucsina ácida y de naranja G en solución acuosa estabilizada por el verde de metilo.

Los eosinatos de tiacinas son los más universalmente empleados desde que fueron ensayados por Romanovsky (1891). Generalmente se designan con el nombre del autor que ha diseñado la mezcla: Romanovsky, Berthsen, Jenner, May-Grünwald, Leishman, Wright, Mac Neal, Giemsa, etc. Nos limitaremos a dar la composición detallada de los tres mejores: Giemsa, Mac Neal y Wright.

■ Fórmula modernizada por Lillie de Giemsa:

eosinato de dimetil tionina:	0,5 g
eosinato de azur de metileno:	2,5 g
eosinato de azul de metileno:	2 g
azul de metileno:	1 g

Todo ello se disuelve en 375 ml de glicerina + 375 ml de alcohol metílico puro y neutro.

■ Fórmula del tetracromo de Mac Neal:

azul de metileno:	1 g
dimetil tionina:	0,6 g
violeta de metileno:	0,2 g
eosina:	1 g

Disolver en una solución de alcohol metílico glicerinado al 40 %: 800 ml.

■ Fórmula de Wright. — Se trata del eosinato de azul de metileno disuelto al 1 por 600 en alcohol metílico. El eosinato de azul de metileno se prepara precipitando una solución de bicarbonato al 0,5 % + azul de metileno al 0,9 % acuoso, disuelto en caliente y dejado a enfriar en una solución de eosina acuosa al 1 %. Se requieren unos 500 ml de solución de eosina por 100 ml de azul. Filtrar y dejar secar.

El panóptico triácido de Pappenheim (1899) es una modificación de la fórmula de Ehrlich del verde de metilo-pironina (cf. p. 238).

El rojo neutro-verde luz de Twort (1924) es utilizado en parasitología.

Monroe y Frommer (1967) modificaron la fórmula de Twort utilizando el verde intenso FCF en sustitución del verde luz, con el ácido fosfotúngstico como mordiente.

El picrato de rosanilina.

La rosanilina ácida trisulfonada-azul de metileno de Ehrlich.

La safranina-verde intenso de Quinn & Bryan (1967). Mezcla preparada justo antes de usar, en partes iguales de dos soluciones al 0,1 %, a los 15 minutos filtrar.

El orange G-cristal violeta de Bensley (1911).

TINCIONES EN BLOQUE

Generalmente, el histólogo procede en primer lugar a la fijación del material, pasa luego a su inclusión y obtención de los cortes para finalmente proceder a la tinción. Sin embargo, para determinados tipos de estudio se obtiene mayor información si se procede a la tinción en bloque de pequeñas piezas, para disociarlas o cortarlas a continuación. Este procedimiento es particularmente recomendado en el caso que interese un estudio topográfico de los tejidos animales o fúngicos. La naturaleza plectenquimatosa de estos últimos permite por lo general una fácil disociación, simplemente presionando ligeramente el cubreobjetos, tras montaje del material; para los tejidos animales normalmente se requiere la obtención de cortes, salvo en el caso de que el material sea extraordinariamente pequeño (así por ejemplo, pequeños organismos). En ambos casos es recomendable montar con gelatina, siguiendo la técnica de Apathy para evitar las posibles retracciones tisulares. Los objetos planos, como las membranas, son adheridas al portaobjetos siguiendo la técnica de Apathy al terpineol, para seguidamente proceder como en el caso de los cortes. Se tendrá la precaución de no efectuar sobretinciones y de no aplicar coloraciones de contraste, cuando el objeto tenga más de 25 µm de grosor.

Para teñir núcleos se tendrán presente las siguientes técnicas:

Lacas progresivas de hematoxilina. — Bien sea alumínicas «hemalumbre», o bien férricas.

El hemalumbre de Masson se prepara añadiendo 0,2 g de hemateína en 100 ml de una solución acuosa saturada de alumbre K.

Se deja actuar de 2 a 5 minutos, vigilando para evitar cualquier sobretinción, se lava con agua del grifo durante 5 minutos. Si hubiera una sobretinción debe diferenciarse con agua acética al 2 % o con una solución al 2 % de alumbre.

La hematoxilina de Wiegert se prepara justo antes de usar mezclando en partes iguales: una solución alcohólica de hematoxilina al 1 % en alcohol de 96° (previamente madurada) y una solución de cloruro férrico acuoso, ácido: 1,16 % de Cl_3Fe en agua destilada + 1 ml de ClH al 25 %. Esta última concentración se obtiene añadiendo 50 ml de agua a 100 ml de ácido clorhídrico comercial.

Se deja actuar de 2 a 5 minutos, se lava con agua del grifo durante 5 minutos; diferenciar con una solución alcohólica de ClH al 0,5 % en el caso de que hubiera una sobretinción.

La trioxihemateína de Hansen es una laca crómica de hemateína que se presta particularmente bien para las tinciones en bloque. Disolver 10 g de alumbre crómico en 250 ml de agua hirviendo hasta que adquiera una tonalidad verdosa, entonces se disuelve en ella 1 g de hematoxilina. Tras enfriamiento deben añadirse 5 ml de ácido sulfúrico al 10 % y después 20 ml de una solución de dicromato K al 10 %, tomando la precaución de verter esta última solución a pequeñas dosis y agitando el conjunto; dejar hervir durante 3 min, enfriar seguidamente. Se conserva bien, pero siempre debe filtrarse antes de usar.

Teñir durante 5 a 10 min, generalmente no provoca sobretinción, lavar cuidadosamente con agua del grifo.

Laca crómica de gallocianina. — Disolver 0,15 g de gallocianina de muy buena calidad en 100 ml de alumbre crómico en solución acuosa al 5 %, hervir durante algunos minutos, filtrar 24 horas después y completar con agua hasta obtener 100 ml.

Teñir durante 24 a 48 horas, lavar durante 5 minutos con agua del grifo, deshidratar, aclarar y montar con una resina.

Laca alumínica de azul de gallamina. — Disolver en caliente 0,5 g de colorante y 5 g de cloruro alumínico en 100 ml de agua destilada, dejar enfriar y filtrar. En el momento de emplear el colorante debe diluirse a la mitad con una solución de cloruro alumínico al 5 %.

Teñir durante 24 a 48 h, lavar con agua destilada durante 12 a 24 h, deshidratar, incluir y cortar.

En el caso de que hubiera una tinción de fondo debido al fijador, debe intentar eliminarse antes de proceder a la tinción con alcohol litinado en el caso de los fijadores pícricos, con alcohol yodado en el caso de los fijadores mercúricos. En este último caso los cortes deben someterse seguidamente a la acción de tiosulfato Na.

Lacas de carmín. — Triturar en un mortero 2 g de carmín y 4 g de bórax, disolverlos en 100 ml de agua, añadir 100 ml de etanol de 70°; teñir con carmín borácico durante varios días hasta su penetración completa dentro de la pieza; eliminar el exceso de colorante con alcohol clorhídrico: 0,5 ml de ClH en 100 ml de etanol de 70°, hasta que el líquido deje de tener color, lo cual significará que habrá habido una total extracción del exceso de colorante; lavar durante 1 o 2 días en alcohol de70°; deshidratar y montar *in toto*, o bien incluir cortar y montar.

Hemalumbre de P. Mayer. — Disolver en caliente 1 g de hematoxilina en 50 ml de agua, dejar enfriar y añadir 0,2 g de yodato Na + 50 g de alumbre de K, y tras disolución completa añadir 50 g de hidrato de cloral + 1 g de ácido cítrico; conservar herméticamente cerrado.

Teñir durante 24 a 48 h, lavar 24 h en agua destilada y nuevamente en agua corriente durante 24 h más, hasta provocar el viraje a azul de los núcleos, deshidratar y montar *in toto* o incluir (no en gelatina), cortar y montar.

Hemateína IA de Apathy. — Preparar y madurar durante tres meses, una solución al 1 % de hematoxilina en etanol de 70°; preparar separadamente: alumbre K: 9 g + ácido salicílico: 0,1 g + ácido acético: 3 ml + agua destilada: 100 ml; mezclar justo antes de usar, a partes iguales, estas dos soluciones con glicerina pura. Se conserva muy bien.

Teñir de 1 a 5 días, atendiendo los casos, lavar con agua bidestilada durante 24 h, la pieza debe estar suspendida; virar durante 4 h con agua del grifo: lavar otras 2 h con agua destilada, deshidratar rápidamente evitando la luz, incluir, cortar y montar.

Reacción nuclear de Feulgen y Rossenbeck. — Hidrolizar durante 75 a 100 min, atendiendo a los fijadores utilizados, con ácido clorhídrico normal, otros 100 min a una temperatura del orden de los 55°; frenar la hidrólisis mediante un lavado con agua fría sulfurosa.

Teñir con el reactivo de Schiff durante 4 a 5 h a temperatura ambiente, lavar con agua sulfurosa (cf. p. 234, durante 18 h, deshidratar, incluir, cortar y montar o bien montar *in toto*.

TINCIONES NEGATIVAS

El término «tinciones negativas» no es excesivamente apropiado, se aplica cuando se logran ciertas «reservas» mediante una tinción de contraste, ésta puede ser del fondo existente entre las muestras cuando éstas están aisladas o bien puede tratarse del fondo citoplasmático, así por ejemplo cuando se trata de poner de manifiesto los diversos orgánulos citoplasmáticos mediante agentes contrastantes utilizados en microscopia electrónica. Las tinciones negativas dieron inicialmente resultados altamente positivos, sobre todo en el caso de poner de manifiesto cilios y flagelos, mediante el sistema del frotis con tinta China o con la nigrosina según G. Deflandre (cf. pág. 204).

INFILTRACIÓN, INYECCIÓN

Infiltrar es hacer penetrar por vía vascular natural los colorantes a fin de teñir el contenido y/o las paredes.

Inyectar es hacer penetrar por vía vascular natural un colorante para evidenciar las cavidades, llenas de aire o de líquido en vivo, en las que se sustituye el contenido por una sustancia coloreada gelificada o polimerizable *in situ*.

El primer método pone en evidencia los límites: paredes del sistema vascular esencialmente, mientras que el segundo sistema pone en relieve el contenido, por sustitución. Se trata por consiguiente de dos técnicas complementarias.

Se requiere, en este caso, una previa anestesia a la fijación. La elección del fijador depende en gran parte de la técnica de tinción por infiltración que se piensa adoptar. En el caso de las inyecciones no debe fijarse antes por perfusión, ante todo deben lavarse los vasos inyectando una solución isotónica a temperatura corporal del animal. Seguidamente se inyecta el material tintorial, se ligan los vasos y seguidamente se procede a la fijación; se decolora, se aclara y se monta en una resina o bien se ataca la materia orgánica de los tejidos para hacer resaltar únicamente el sistema vascular.

El material inyectado es en todos los casos previamente teñido, bien sea por carmín, por azul de Prusia o por tinta China. La gelatina inicialmente empleada para llevar a cabo esta técnica ha sido sustituida por resinas vinílicas, cuyo monómero se polimeriza *in situ* o si se emplea el polímero éste debe ser diluido con la acetona.

Estas técnicas son más utilizadas para trabajos de tipo anatómico que para los estudios histológi-

cos, por ello no nos extenderemos sobre este tema. Para mayor información, consúltense los trabajos de Trueta y colaboradores (1947).

AUTOMATIZACIÓN DE LAS TINCIONES

Si el número de portaobjetos a estudiar diariamente es suficientemente elevado, las tinciones de Papanicolaou, de Harris Shorr y del May-Grünwald Giemsa pueden automatizarse. Existen en el comercio diversos aparatos que aseguran automáticamente el paso de las preparaciones por los diferentes baños.

Para cada aparato los constructores han establecido unos programas que varían según las tinciones a efectuar.

A continuación, reseñamos el programa utilizado en un aparato de marca Shandon Elliot para la tinción policrómica de May-Grünwald Giemsa:

1	May-Grünwald puro sin dilución	4 minutos
2	May-Grünwald diluido a 1/4	4 minutos
3	Lavado con agua tamponada Composición del tampón: — fosfato monopotásico: 1 g — fosfato disódico: 5 g — agua destilada: 5 l	1 minuto
4	Lavado en agua tamponada	1 minuto
Después de dos series de tinciones debe renovarse el líquido de los tanques 3 y 4.		
5	Giemsa diluido en la proporción: 150 ml de Giemsa + 850 ml de agua tamponada	5 minutos
6	Giemsa diluido	5 minutos
7	Giemsa diluido	10 minutos
8	Lavado con agua tamponada	1 minuto
9	Lavado con agua tamponada	1 minuto
10	Lavado con agua tamponada	2 minutos

II. — APLICACIONES

TINCIONES SUBESPECÍFICAS

Aunque este Manual de Microscopia no sea un manual de citoquímica o de histoquímica todo buen microscopista debe ser conducido en la elección inteligente de técnicas capaces de facilitarle la ulterior interpretación de los resultados. Atendiendo a la especificidad bioquímica hemos intentado agrupar en este capítulo las técnicas que permiten obtener una cierta aproximación sobre la naturaleza de los componentes teñidos. Para mayor información sobre esta cuestión remitimos al lector a los tratados de Histoquímica, particularmente al de M. Gabe (1968).

Calificamos de subespecíficos los métodos seleccionados, dado que se requieren condiciones mucho más precisas para conseguir la especificidad, porque la especificidad únicamente existe en ausencia de otros constituyentes, dado que las contrapruebas o controles deben hacerse en paralelo para asegurar la especificidad.

Estar seguro de una especificidad implica grandes precauciones teóricas y prácticas: deben comprenderse los mecanismos, generalmente complejos, que se desencadenan; conocer las posibles interferencias, las extracciones que ocasionalmente pueden provocar los reactivos utilizados, las incompatibilidades que puedan existir entre los reactivos utilizados sucesivamente, el grado de fiabilidad de los productos usados, principalmente el de los colorantes, el grado de confianza que puede otorgarse a tal o cual autor conocido por su sentido crítico, su habilidad como manipulador o por el contrario las imprecisiones presentes en sus publicaciones.

Sólo después de una larga práctica micrográfica, guiado por la selección presentada en este capítulo, aconsejamos al lector que profundice en la vía histoquímica en el caso de que posea sólidos conocimientos de química, así como citológicos, máxime si quiere proceder a análisis comparativos transtaxinómicos.

Tinciones de los elementos tisulares

Salvo en el caso de que se trate de localizar precisamente una sustancia mediante una reacción histoquímica o citoquímica específica, el microscopista utilizará más de una técnica tintorial. Prefiere preparaciones policrómicas, en las que los núcleos, el citoplasma, las paredes celulósicas, los vasos lignificados, los mucílagos pécticos, los lípidos, entre otros, queden bien diferenciados por diversas coloraciones.

En la mayoría de los casos estas coloraciones no se llevan a cabo con un solo componente, generalmente son varios colorantes que interfieren

y dan un resultado variable que depende de las condiciones de trabajo y de la mayor o menor reactividad de las estructuras. Si bien es cierto que estas tinciones policrómicas son utilizadas universalmente y han permitido avanzar considerablemente a la microanatomía, a la histología y a la citología y su uso no disminuye ni desaparecerá, aunque la microscopia electrónica pueda eclipsar ligeramente los trabajos eminentemente fotónicos.

Como métodos rápidos para el diagnósticos en histología y citología normal y patológica son insustituibles. Difícilmente se puede pensar en hacer una fórmula sanguínea sin contar con dichas técnicas tintoriales. La celebridad de Papanicolaou se debe más a la fórmula compleja de coloración que lleva su nombre que a su magnífico Atlas de citología exfoliativa que ha sido posible gracias a la aplicación de sus técnicas policrómicas.

Para la comprensión de esta parte del Manual de Microscopia nos hemos visto obligados a escoger como títulos de los capítulos conceptos simples como el de núcleo, citoplasma, lípidos, etc. Pero al leerlos no debe extrañarse no encontrar demasiadas tinciones simples. Generalmente, hay una técnica dominante, íntimamente asociada a complementos que la práctica no disocia nunca.

Algunas divisiones son arbitrarias. Tanto el anatómico, como el histólogo y el citólogo tiñen núcleos, pero sus objetivos son distintos. Por ello, no debe sorprender al lector encontrar en los tres casos técnicas comunes a variantes próximas, al lado de técnicas muy específicas de cada área.

Tinciones relacionadas con la detección del poder reductor

Tanto si el poder reductor del material es propio como si lo ha adquirido artificialmente, hay un cierto número de técnicas para ponerlo de manifiesto. Estas tinciones no tienen especificidad histoquímica, ponen en evidencia: fenoles, pirroles, indoles, ácido ascórbico, hexosas, melaninas, uratos y sus derivados, los lípidos no saturados, los compuestos portadores de grupos carbonilos, etcétera.

Hay tres métodos: la reacción del azul de Prusia, la reducción de las sales metálicas: de plata mercurial, o de osmio, la reducción de las sales de tetrazolio.

Reacción del azul de Prusia. — El ferrocianuro férrico preparado extemporáneamente mezclando dos soluciones: de cloruro férrico 75 ml al 1 % y de ferrocianuro de K, 10 ml al 1 % puede ser reducido a *verde de Prusia* por los reductores débiles, en *azul de Prusia* por los reductores más fuertes. Durante el tratamiento debe renovarse el reactivo cada diez minutos. Parar la acción en el momento que el colorante deje de intensificarse, lavar con agua; eventualmente hacer una tinción de contraste con la safranina; lavar con agua, deshidratar y montar.

Reducción de los complejos de plata. — Añadir 100 ml de una solución acuosa al 3 % de hematoxilina tetramina, 5 ml de una solución acuosa de nitrato de plata al 5 %, agitar hasta que se disuelva el precipitado; conservar en frío.

Lavar el objeto con gran cuidado, tratar en la oscuridad durante 24 a 36 h en la solución argéntica, lavar con cuidado en la oscuridad; virar 5 min con cloruro de oro al 0,1 % acuoso; lavar; fijar con una solución acuosa al 5 % de tiosulfato de Na; lavar con agua corriente; tinción eventual de fondo; deshidratar; montar. Los materiales reductores quedan teñidos de pardo a negro.

Reducción del ácido ósmico (cf. pp. 233 y 249).

Reducción de las sales de mercurio. — La mezcla: bicloruro de mercurio al 25 % + tiocianato de amonio al 20 % acuoso en medio acidificado extemporáneamente por ácido sulfúrico al 20 %, a partes iguales en volumen, libera mercurio metálico negro en contacto con los reductores. No se conserva.

Reducción de las sales de tetrazolio. — Por abertura del ciclo, estos compuestos son reducidos a «Formazán» teñido. Se puede utilizar de la misma forma el azul de tetrazolio; el azul nitrado de tetrazolio; solución de tetrazolio al 0,5 % en etanol absoluto 5 ml + ácido acético N/1: 15 ml + ClNa: 1 g + tampón borácico (de pH: 8,8): 20 ml + agua dest.: 15 ml. Conservar en frío y en la oscuridad.

Tratar durante 2 h a 60° por el reactivo; lavar con agua dest.; teñir eventualmente los núcleos con hemalumbre; lavar 5 min con agua corriente; montar en un medio hidrófilo. Los componentes reductores se tiñen de color púrpura.

Puesta de manifiesto de compuestos minerales

La aplicación de las sondas electrónicas asociadas al microscopio electrónico de barrido parecían haber disminuido el interés de aplicar otros métodos de tinción y de precipitación de los compuestos inorgánicos; sin embargo, esto no ha sido así, ya que el microscopio electrónico de barrido únicamente permite el análisis en superficie y su precio no es asequible a todos. Dado que este capítulo habitualmente es muy reducido en los tratados de Microscopia general, basándonos en

los treinta años de experiencia sobre el tema lo desarrollaremos más profundamente. Los cationes metálicos son más fáciles de evidenciar y menos difusibles que los aniones. Indicaremos los métodos tintoriales a utilizar para uno de ellos, así como los microprecipitados cristalinos.

Son preferibles los primeros cuando la abundancia de compuestos orgánicos pueda interferir; los segundos tienen un límite de sensibilidad extremadamente elevada para diluciones muy débiles.

Búsqueda de cationes

Véase la página 227 para hallar las concentraciones de los reactivos.

■ Plata. — Ag. Espontáneamente no existe en los tejidos. En los casos de argirosis experimentales la plata se fija sobre las proteínas y los mucopolisacáridos, impregnándolos de color negro o pardo-negruzco. Esta pigmentación desaparece con el diferenciador de Farmer: ferricianuro de K: 1 g + tiosulfato de Na: 20 g + agua: 100 ml.

Da un precipitado incoloro de láminas hexagonales alargadas de CH_3COOAg con el acetato de Na en solución acuosa.

Precipitado rojo ladrillo de cristales que se disponen en haces o en microcristales de $Cr_2O_7Ag_2$ en presencia de dicromato de Na solución acuosa (límite de sensibilidad: 0,2 µg).

■ Aluminio. — Al. Se disuelve tricarboxilato de Na o Am de aurina al 2 % en un tampón de pH: 5,2; se tratan los cortes fijados con formol o con alcohol durante 5 min a 75°. Se lava con carbonato amónico tamponado a 1,6 M durante algunos segundos para diferenciar; si se quiere puede teñirse el fondo con azul de metileno al 1 por 10 000 o con una solución acuosa saturada de ácido pícrico; deshidratar y montar en una resina. El aluminio se tiñe de color rojo intenso. Si hay cromo debe transformarse previamente en cromato con el amoníaco añadido al agua oxigenada.

La adición de cloruro de cesio en solución acuosa provoca un precipitado cristalizado incoloro en forma de octoedros cúbicos.

■ Arsenio. — As. Se detecta bajo la forma del anión AsO_3. Véase éste.

■ Oro. — Au. Tratar el material con cloruro estañoso al 5 % añadiéndole un 10 % de clorhídrico concentrado, durante 10 min en baño maría hirviendo; lavar; eventual tinción de contraste en rojo o verde; el oro queda de color marrón a negro.

Tratar con tiocianato de cobalto en solución acuosa: precipitado cristalizado de color rojo-anaranjado, en cristales estrellados, con cuatro radios y microcristales de $(SCN)_2CO.(SCN)_2Au$.

■ Bario. — Ba. Generalmente es imposible separar mediante una técnica tintorial el calcio, del bario y del estroncio. Por el contrario, el acetato de zinc-uranilo en solución acuosa da un precipitado incoloro cristalizado de acetato triple de uranilo de zinc y de sodio, en ocasiones mezclado con un precipitado amarillo de acetato doble de uranilo y sodio.

El fluosilicato de zinc en solución acuosa da cristales fusiformes.

■ Berilio = Glucinium. — Be. Se suprimen las interferencias con el calcio, suprimiéndolo con un ácido diluido. Se tiñe con azurina-solocromo al 0,2 % preparado con sosa al 2 %; lavar, deshidratar, montar; da color negro que vira a pardo-rojizo al tratarlo con un ácido.

Forma un precipitado blanco microcristalino o amorfo con el amoníaco.

■ Bismuto. — Bi. Se detecta por la acción del reactivo de Léger preparado extemporáneamente: sulfato de quinina al 2 % en solución acuosa + 10 gotas de ácido nítrico al 25 % mezclado en partes iguales con IK al 4 % acuoso. Dejar actuar algunos minutos; lavar con ácido nítrico diluido; escurrir, deshidratar; montar. El bismuto queda teñido de color amarillo-anaranjado.

Una solución de yoduro de zinc provoca la formación de un precipitado microcristalino amarillo-anaranjado de negro de BiI_3, en el seno de una solución amarilla o roja-anaranjada.

La acción de la solución acuosa de carbonato K provoca la formación de un precipitado amorfo que se transforma en cristales incoloros altamente refringentes de carbonato doble de bismuto y de potasio.

El cloruro de cesio da un precipitado incoloro en láminas hexagonales que se tiñen de color rojo anaranjado al añadir trazas de NaI.

■ Calcio. — Ca. Se encuentra bajo tres formas: iónico y soluble, iónico e insoluble, combinado. Únicamente la microincineración revela las tres formas. La forma iónica insoluble se tiñe con las lacas de hematoxilina o del azul de gallamina, a un pH superior a 9.

La alizarina-sulfonato de Na en solución acuosa al 2 %, a pH: 4,3 lo tiñe en 5 min con un lavado en agua, precipitando sobre las partes ricas en calcio una masa rojiza-anaranjada, birrefringente.

El ácido sulfúrico concentrado da lugar a un precipitado de sulfato cálcico en cristales prismáticos planos cuyas caras terminales son oblicuas,

macladas con láminas rectangulares planas y poco refringentes.

■ CADMIO. — Cd. El cloruro de cesio da romboedros incoloros.

El tiocianato de mercurio, amonio y sódico da un precipitado incoloro amorfo, transformándose en delgadas láminas asociadas a maclas y a esferocristales.

Los oxalatos dan prismas tubulares incoloros.

■ COBALTO. — Co. El tiocianato de mercurio, amonio y de sodio dan un precipitado azul de cristales triangulares o agregados erizados de espinas, de tiocianato doble de Hg-Co. Los axalatos dan pequeños prismas maclados.

■ CROMO. — Cr. Se oxida mediante agua oxigenada dando lugar a un anión: cromato, demostrable por precipitación en cromato de plata por el nitrato de plata: en forma de grandes agujas irregulares de color rojo-anaranjado.

■ CESIO. — Ce. El ácido silicotúngstico da un precipitado en forma de pequeños cristales redondeados que se forman instantáneamente (el rubidio también).

El ácido perclórico y el fosfato de cadmio forman masas dendríticas o esqueléticas de ClO_4Cs que, en caliente, se transforman en bipirámides o en tabletas hexagonales de Cs_4CdCl_6.

■ COBRE. — Cu. Debe tratarse durante 10 min en ácido ditioxámico al 0,1 % en etanol de 70°; después se pone en evidencia con la aplicación de vapores de ClH; introducir 200 mg de acetato sódico, agitar y dejar actuar durante 48 h; sumergir en etanol de 70° durante 1 h. El Cu adquiere una tonalidad negro-verdosa.

Una solución de tiocianato de cobalto da un precipitado cristalizado negruzco o púrpura-negro en bolas cristalinas de $(SCN)_2Cu$.

El tiocianato doble de Hg y de Co da un precipitado amarillento o verde de cristales laminares o en rosetas fusiformes de tiocianato doble de Hg y Cu.

■ HIERRO (FERROSO). — Fe^{++}. Es la reacción del azul de Turnbull que es específica para el ion ferroso: preparar extemporáneamente ferricianuro de K al 2 % en agua acidificada al 2 % con ClH; lavar; el hierro aparece de color azul. En ausencia de iones ferrosos se pueden reducir los iones férricos para efectuar esta reacción. Únicamente deben tratarse durante 10 min en una solución al 20 % de sulfuro de amonio recién preparado y tiñe de color amarillo claro; después se procede como en el caso anterior. El Fe^{++} combinado se desenmascara tratándolo con un ácido diluido con sulfuro de amonio.

■ HIERRO (FÉRRICO). — Fe^{+++}. Además de la reacción anterior también puede aplicarse la reacción del azul de Prusia; en este caso se utilizará el ferrocianuro en lugar del ferricianuro, igualmente en una solución clorhídrica; tiñe de azul el Fe. Es una reacción extremadamente sensible: 0,002 μg.

El tiocianato de cobalto en medio sulfúrico da una tinción rojo sangre.

■ MERCURIO (MERCURIOSO). — Hg^{+}. Se reduce la sal en forma de mercurio metálico negro por la acción del cloruro estañoso al 25 % en solución acuosa acidificada por la introducción de un 25 % de ácido clorhídrico. El tiocianato de cobalto da un precipitado blanco amorfo que se vuelve amarillento en presencia del yoduro de zinc.

El dicromato K da microscristales que a la larga adoptan una disposición en cruz, se trata de un cromato mercúrico.

■ MERCURIO (MERCÚRICO). — Hg^{++}. El tiocianato de cobalto da lugar a cristales azules dispuestos en láminas alargadas, agujas en rosetas espinosas de tiocianato doble de Hg y Co.

■ POTASIO. — K. El cobaltihexanitrito de Na a 0° se utiliza en solución acuosa preparada de la siguiente manera: a 200 ml de una solución acuosa al 66 % de nitrito de Na debe añadirse una mezcla formada por 50 ml de una solución acuosa de nitrito de cobalto al 50 % acidificado por 12,5 ml de ácido acético; expulsar los vapores nitrosos por un burbujeo de aire, filtrar; dejar actuar sobre el hielo durante 15 min, escurrir, lavar rápidamente con agua helada; el potasio da granulaciones amarillas.

El ácido perclórico da un precipitado incoloro cristalizado.

■ LITIO. — Li. Precipita en forma de fosfocarbonato de litio en forma de cristales fusiformes por la acción del fosfato de potasio.

■ MAGNESIO. — Mg. Se tiñe de color rojo intenso al tratarlo con una mezcla preparada extemporáneamente de amarillo de tiazol acuoso al 0,2 % y de sodio 2N en partes iguales durante una hora; lavar; la coloración es de tipo temporal.

También se puede teñir de color azul intenso por una solución al 1 % en sosa al 5 % de paranitrobenceneazol-1-naftol (magneson).

Una mezcla de fosfato y de carbonato de K lo precipita en cristales en forma de X, en forma de tapa de sarcófago o bien de triángulos truncados.

■ MANGANESO. — Mn. Se caracteriza bajo forma de doble fosfato de manganeso y de amonio por la acción de una solución de fosfato de K

y de carbonato de amonio; los cristales son incoloros, prismáticos o rómbicos.

■ Sodio. — Na. Se obtiene un precipitado de antimoniato de Na por la acción del antimoniato de K.

Se obtiene un precipitado de acetato triple de uranilo, de zinc y de sodio: en cristales incoloros, o de cristales amarillos de acetato doble de uranio y de sodio haciendo actuar el acetato doble de uranilo y de zinc en solución acuosa.

■ Amonio. — NH_4. El ácido silicotúngstico precipitado de pequeños cubos y dodecaedros incoloros de su sal de amonio.

■ Níquel. — Ni. La dimetilglioxime lo precipita en forma de agujas o haces pardo violáceos, insolubles en el amoníaco.

■ Plomo. — Pb. El rodizonato de Na en solución acuosa al 0,5 % actuando durante 40 min lo tiñe de color pardo oscuro.

El yoduro de zinc lo precipita en agujas hexagonales tricroicas amarillas.

■ Paladio. — Pd. El tiocianato de cobalto da un precipitado cristalino, rosa carne, en forma de prismas.

■ Platino. — Pt. El tiocianato de cobalto forma un precipitado marrón en forma de bolas cristalinas.

■ Rubidio. — Rb. Es difícilmente diferenciable del cesio.

■ Antimonio. — Sb. Forma cristales hexagonales en rosetas de 6 ramas, rojo-amarillento, al tratarlo con el yoduro de zinc en solución acuosa nítrica.

■ Estaño. — Sn^{++}, estañoso y Sn^{++++} estánico. El yoduro de zinc en solución acuosa y nítrica da un precipitado de cristales amarillos octoédricos para las sales estáñicas, en láminas hexagonales y agujas muy largas en el caso de las sales estañosas.

■ Estroncio. — Sr. El carbonato doble de uranio y de zinc da pequeños cristales más o menos redondeados o bien aciculares.

■ Titanio. — Ti. Reducido en Hg metálico negruzco el tiocianato triple de mercurio amónico y sodio.

La adición de H_2O_2 da una coloración amarillenta.

■ Talium. — Th. El dicromato de Na da un precipitado amarillo, amorfo, acompañado de prismas incoloros.

■ Uranio. — U (bajo forma de uranilo: UO_2). Se precipita en forma de cristales triangulares incoloros o amarillentos de acetato triple o doble de uranilo, magnesio y sodio por acción de una mezcla de acetato sódico y magnésico en solución acuosa, ligeramente acetificada.

■ Zinc. — Zn. Se trata con nitroprusiato de Na en solución acuosa al 10 %, se lava, a continuación se tira una gota de una solución concentrada de sulfuro de Na: color púrpura intenso.

El tiocianato de Hg y de Am da unos cristales incoloros, bifurcados, en penacho o dendríticos.

Búsqueda de aniones

■ Arsenioso. — AsO_3^{---}. El yoduro de zinc en solución nítrica da un precipitado amarillo verdoso en forma de láminas hexagonales.

■ Arsénico. — AsO_4^{---}. El nitrato de Ca en medio amoniacal da cristalitos en forma de X o de piedra tumular. Se puede oxidar el ion arsenioso en arsénico por el agua oxigenada y practicar a continuación esta reacción.

■ Bórico. — BO_2^-. El tinte de Curcuma en medio sulfúrico da una coloración rosa. Sensibilidad: 0,0005 μg.

■ Bromo, bromuro. — Br. Tiñe el almidón de color amarillo-pardusco.

■ Brómico. — BrO_3^-. Misma reacción que el anterior.

■ Cloro, cloruro. — Cl^-. El nitrato de plata en solución nítrica da un precipitado de cristales cúbicos volviéndose de color negro violáceo a la luz. Se puede acelerar e intensificar este ennegrecimiento por un revelador fotográfico.

■ Hipocloroso. — ClO^-. La misma reacción pero los cristales formados son efervescentes con el amoníaco.

■ Clórico. — ClO_3. El carbonato de K da cristales incoloros. El cloruro de cesio da láminas cuadradas incoloras.

Coloración azul con el sulfato de difenilamina.

■ Perclórico. — ClO_4^-. El carbonato K da cristales incoloros.

■ Cianuro. — CN^-. El tiocianato de cobalto da un precipitado amorfo azul.

■ Ciánico. — CNO^-. El mismo reactivo da por evaporación cristales aplanados azules; el nitrato de plata da cristales en láminas delgadas incoloras con bordes dentados.

■ Carbonato. — CO_3^{--}. El tiocianato de cobalto da un precipitado amorfo blanco violáceo, efervescente en los ácidos.

■ Bicarbonato. — CO_3H^-. El nitrato de plata forma un precipitado microcristalino o amorfo con efervescencia de carbonatos de plata blanco o amarillento.

■ Crómico. — CrO_4^{--}. Dicrómico. — Cr_2O_7. Da con el nitrato de plata en medio ácido agujas o cristales fusiformes rojo-amarillento; en medio neutro da grandes agujas sinuosas de color rojo-anaranjadas.

■ Fluoruro. — F^-. El nitrato de litio forma precipitados de pequeños cristales de cuatro radios o en rosetas incoloras.

■ Ferricianuro. — $Fe(CN)_6^{---}$ Con el nitrato de hierro da azul de Prusia.

■ Ferrocianuro. — $Fe(CN)_6^{----}$. Inicialmente oxidado por H_2O_2 da enseguida la misma reacción que la anterior.

■ Nitroprusiato. — $Fe_2(CN)_{10}(NO_2)_2^{----}$ El tiocianato de amonio da lentamente pequeños cristales cuadrados de color amarillo limón.

■ Yodo y Yoduro. — I^-. Absorción específica en UV a 3200-3300 Å; el tiocianato de Hg en medio ácido da un precipitado tabular y octaedros cuadráticos rojo-anaranjados.

■ Yodato. — IO_3^-. Tablas incoloras o en roseta grisácea con NO_3Ag amoniacal.

■ Permanganato. — MnO_4^-. Reduce en un precipitado amorfo pardo negrusco tras la aplicación del tiocianato de cobalto.

El tiocianato de Hg da cristales violáceos de tiocianato doble de mercurio y de manganeso.

■ Nitroso, nitrito. — NO_2^-. El tiocianato de cobalto en medio potásico da un precipitado de nitrito doble de Co y K.

■ Nítrico, nitrato. — NO_3^-. Coloración azul con el sulfato de difenilamina.

■ Hipofosforoso. — $PO_2H_2^-$ y fosforoso PO_3H^{--}. Reduce al estado de mercurio metálico negro tras tratamiento de una solución sulfúrica de tiocianato de cobalto; en frío para el primero y en caliente para el segundo.

■ Fosfato, fosfórico. — PO_4^{---}. El molibdato amónico en solución acuosa precipita en frío en pequeños octaedros y cubos amarillo-verdoso.

En medio nítrico al que se le ha añadido ferrocianuro de K se obtiene una coloración azul intensa de azul de molibdeno. La misma reacción tiene lugar pero en caliente con el anión pirofosfórico $P_2O_4^{----}$

■ Azufre, sulfuro. — S^{--}. El tiocianato de cobalto da en frío un precipitado microcristalino pardo-negrusco.

■ Tiocianato, sulfocianato. — SCN^-. Con el nitrato de hierro da una coloración rojo sangre; con los carbonatos de Hg, Co, Cd da un precipitado azul con forma de agregados erizados de espinas.

■ Silicio. — Si^{--}. Microincineración y examen del espodograma con luz polarizada.

■ Sulfuroso, sulfito. — SO_3^{--}. El nitrato de plata amoniacal da un precipitado microcristalino blanco, rojizo y finalmente negrusco.

■ Sulfúrico, sulfato. — SO_4^{--}. Precipitado incoloro con el nitrato de plata virando a rojo-negrusco al añadir cloruro ferroso amoniacal.

El acetato de Pb precipita en sulfato de Pb insoluble en NO_3H diluido, en el que se lava; se transforma en sulfuro de Pb sepia por el sulfuro de amonio.

El nitrato de calcio y de amonio da prismas planos de caras terminales oblicuas o de cristales aciculares en haces.

■ Acético. — CH_3COO^-. El nitrato de plata da láminas hexagonales nacaradas.

■ Oxálico. — $COO.COO^{--}$. Precipita en octaedros minúsculos poco refringentes procedentes de un precipitado amorfo.

El tiocianato de Co da pequeños prismas incoloros, frecuentemente maclados.

■ Tartárico. — $COO(CHOH)_2COO^{--}$. El nitrato de Ca da maclas enormes y agujas incoloras.

■ Uratos. — El ácido silicotúngstico da cristales cúbicos bastante grandes.

Búsqueda simultánea de cationes y de aniones

Las localizaciones de *cationes* y de *aniones minerales* particularmente fáciles a realizar por las reacciones de precipitación de forma sistemática de la siguiente manera. Son particularmente úti-

les en histología vegetal, las paredes celulares se oponen a la difusión de los iones presentes en la célula.

Preparar los 15 reactivos siguientes, según Steimetz (1937).

Reactivo A1. — Ácido silicotúngstico 0,5 g + tiocianato de Co: 1 g + Agua: 10 ml.

Reactivo A2. — Yoduro de Zn recientemente preparado: 0,6 g + acetato de uranilo: 0,5 g + ácido acético cristalizado 0,5 ml + agua: 7 ml. Conservar el reactivo sobre cloroformo que contenga un fragmento de zinc metálico; agitar de vez en cuando.

Reactivo A3. — Ácido nítrido puro: 5 ml + ácido perclórico al 20 %: 15 ml + cloruro de cadmio: 1,5 g + fosfato de cadmio: 0,2 g.

Reactivo B1. — Cloruro mercúrico: 5 g + tiocianato de amonio: 4 g + tiocianato de sodio: 1 g + agua: 5 g.

Reactivo B2. — Fosfato monopotásico: 0,5 g + oxalato de amonio: 0,05 g + carbonato de potasio seco: 1 g + tiocianato de amonio: 1 g + agua: 7 ml.

Reactivo B3. — Ácido sulfúrico puro: 2 ml + agua: 8 ml.

Reactivo B4. — Cloruro de cesio sólido.

Reactivo B5. — Difenilamina: 0,04 g + agua: 1,5 ml + ácido sulfúrico puro: 8 ml.

Reactivo C1. — Nitrato de plata: 1,5 g + nitrato de litio: 0,5 g + dimetil glioxima: 0,02 g + agua: 5 ml.

Reactivo C2. — Amoníaco puro (sin carbonatos ni cloruros).

Reactivo C3. — Nitrato de calcio: 2 g + nitrato de amonio: 1 g + agua: 8 g.

Reactivo D1. — Nitrato férrico: 2 g + dicromato de sodio: 0,5 g + clorato sódico: 0,5 g + agua: 10 g.

Reactivo D2. — Acetato mercúrico: 0,1 g + acetato de cobalto: 0,1 g + acetato de cadmio: 0,1 g + acetato magnésico: 2 g + acetato sódico: 1 g + agua: 10 ml + ácido acético cristalizado: 10 gotas.

Reactivo D3. — Cloruro de platino: 0,5 g + agua: 5 ml.

Reactivo D4. — Molibdato amónico en polvo.

Únicamente los reactivos que llevan la misma letra son compatibles. Se utilizarán por consiguiente cuatro preparaciones etiquetadas con A, B, C, D, sobre las que se hará actuar sucesivamente los reactivos y se comprobará seguidamente al microscopio: sobre A: una gota de A1, después de A2, después de A3; sobre B: una gota de B1, después de B2, y así sucesivamente.

Para más detalles, aconsejamos que se consulte la importante obra de Steimetz (1937).

Búsqueda global de aniones

Una tinción global permite poner en evidencia los aniones, independientemente del tipo que sean, se trata de la tinción con **pararrosanilina-diparaldehído.**

Este colorante se obtiene según Gomori haciendo actuar sobre una solución de pararrosanilina clorhídrica en una solución al 0,5 % en etanol de 70°: 1 ml de ClH puro + 1 ml de paraldehído durante dos o tres días. Se observa un viraje al violeta para formar un nuevo colorante. Sólo se conserva durante 8 días. La técnica de preparación sugerida por Gabe es preferible: en lugar de etanol se utiliza una solución acuosa de pararrosanilina clorhidrato y se aumenta la cantidad de ClH. El nuevo colorante es insoluble en agua, precipita, se lava en agua y se conserva en seco. La solución colorante que se conserva bien es una solución al 0,125 % de pararrosanilina-diparaldehído en etanol de 70° + 1 ml de ácido acético. Teñir durante 5 min; lavar rápidamente; tratar de 10 a 20 s por etanol de 96°, al que se le ha añadido un 0,5 % de ClH concentrado. Lavar, deshidratar, montar en una resina. La coloración obtenida es de color violeta intenso.

Puede sustituirse este colorante por la tionina-paraldehído obtenida de la misma manera o por algunas aftalocianinas: azul alcián, verde alcián, amarillo alcián, azul astra.

Eosinofilia o acidofilia

Detecta la acumulación de grupos básicos en las proteínas.

La tinción con el amarillo naftol sulfonado es la más frecuentemente utilizada; teñir durante un cuarto de hora por una solución acetificada al 1 % acuosa al 1 % de amarillo naftol sulfonado; lavar 24 h en ácido acético al 1 %; enjuagar; deshidratar con alcohol butílico terciario: debe evitarse el etanol. Las acumulaciones de grupos básicos se observan por el color amarillento; absorción máxima: 435 mμ.

Himes y Moriber han combinado esta reacción con la nuclear y la del PAS para teñir los núcleos de color azul o verde, las estructuras PAS positivas en rojo y las proteínas básicas en amarillo. Preparar las cinco soluciones siguientes: **A)** Para blanquear: añadir a 90 ml de agua, 5 ml de una solución acuosa de metabisulfito de K + 5 ml de ClH; no se conserva. **B)** Disolver 1 g de dimetiltionina en el reactivo precedente; antes de utilizar añadir algunas gotas de una solución **A** recién preparada. **C)** Disolver 0,8 g de ácido periódico en 90 ml de agua al 0,2 N de acetato de Na. **D)** Reactivo de Schiff (cf. p. 229). **E)** Disolver 1 g de amarillo naftol sulfonado en 100 ml de ácido acético acuoso al 1 %, diluir 50 veces en el momento de usar con ácido acético acuoso al 1 %. Hidratar e hidrolizar los cortes a 60° con ClH normal; lavar con cuidado; tratar con la solución **B** de dimetiltionina durante 5 min; lavar con agua destilada; blanquear dos veces con el reactivo **A** (dos minutos cada vez); lavar con agua destilada; oxidar durante 2 min en el baño **C** de ácido periódico: lavar con agua corriente; tratar durante 2 min con el reactivo **D** de Schiff; blanquear 2 veces 2 min en el reactivo **A**; lavar, enjuagar. Teñir du-

rante dos minutos por la solución **E**; deshidratar con alcohol butílico terciario; aclarar y montar en una resina.

En la variante de Binson se añade una solución de azul de alcián al 0,1 % en un tampón de pH: 2. Se tiñen los mucopolisacáridos y mucinas ácidas en azul claro o verde haciendo actuar esta solución 10 min después del primer tiempo de tinción a la dimetiltionina.

Cianofilia o basofilia

Se llaman basófilas todas las sustancias que fijan electivamente los colorantes básicos. Esta basofilia es debido a presencia de grupos ácidos en sus moléculas. Son principalmente los radicales sulfato de los mucopolisacáridos ácidos, los radicales fosfatos de los ácidos nucleicos, los radicales carboxilo de las proteínas, el ácido úrico, algunos glúcidos, algunos lípidos, algunas cetonas. Esta enumeración permite concluir inmediatamente que la basofilia es mucho más importante y general que la acidofilia. Algunos tratamientos previos modifican las condiciones de manifestación de la basofilia, que siempre es relativa: se manifiesta de forma diferencial atendiendo al tipo de colorantes básicos utilizados. Después de la tinción los tratamientos de fondo pueden hacer virar el color e interferir en la visualización; algunos lavados ácidos o básicos refuerzan o atenúan las coloraciones.

Las afinidades basófilas son bien reforzadas por la fijación, sobre todo con el formol y los fijadores formolados. Un incremento de la concentración del colorante actúa reforzando la tinción hasta que se establezca un determinado equilibrio. La naturaleza del colorante, siempre básico, la fuerza iónica de la solución tintorial, su pH, son también factores a tener en cuenta.

Es preferible utilizar el término «cianofilia» en lugar de basofilia, siguiendo a Ebnez.

Cuando se utilizan colorantes neutros con fines topológicos no se pueden deducir los resultados, conclusiones basófilas o acidófilas, ya que la presencia de los dos tipos de colorantes modifica las afinidades.

Los colorantes básicos más utilizados son tiacinas: azul de toluidina, azul de tionina, dimetiltionina, monometiltionina, azur de metileno, azul de metileno. La coloración obtenida es metacromática en rojizo, violeta a rojo intenso u ortocromática en azul.

Preparar una solución al 0,2 % del colorante escogido en un tampón a pH: 4,2 y separadamente una solución de molibdato amónico al 5 % en agua destilada; desparafinar; hidratar; teñir 5 min con molibdato; lavar 5 min; deshidratar, aclarar; montar en una resina. Cuando la deshidratación se ha efectuado con alcohol butílico terciario puede omitirse el paso por el molibdato. Atendiendo a su naturaleza, los compuestos basófilos toman una coloración «ortocromática» azul o «metacromática» de rojizo a violáceo, o «metacromático γ» rojo púrpura.

Véase la página 235 para estudiar más detenidamente la metacromasia.

Tinciones de los grupos aldehídicos

Una reacción domina a las restantes: la denominada reactivo de Schiff. Sin embargo, no debe omitirse citar que los complejos de plata amoniacal, la bencidina, la ortodianisidina, las fenilhidracinas, la parafenileno diamina pueden también usarse.

El reactivo de Schiff fue creado en 1867 pero hasta 1924 no fue introducido en la técnica histológica, tras los trabajos de Feulgen.

El reactivo de Schiff. — Se prepara el *leucoderivado* de la pararrosanilina en 15 ml de ácido clorhídrico normal; separadamente, disolver 0,5 g de metabisulfito de Na en 85 ml de agua destilada; mezclar las dos soluciones; dejar reposar 24 h; tras decoloración, el líquido debe tener un color amarillento claro. Si conserva un color rosado es debido a que la pararrosanilina utilizada no es pura; entonces puede filtrarse sobre carbón activado tras haber añadido 0,3 g de carbón y agitar durante 30 segundos.

Este tratamiento conduce a la formación de ácido *n*-sulfínico pararrosanilina leucosulfónica, que tiene la propiedad, en presencia del aldehído, de condensarse atendiendo a las características moleculares, para dar lugar a un nuevo compuesto tintorial quinónico, muy distinto del reactivo de partida.

Tratar con el reactivo de Schiff en un recipiente cerrado durante un tiempo variable, que oscila de 5 min a 2 h; lavar con exceso de agua destilada o sulfurosa, añadiendo o no unas gotas de ácido clorhídrico N; seguidamente lavar 10 min con agua del grifo; eventualmente puede hacerse una tinción de contraste; deshidratar; montar, o montar directamente en un medio hidrófilo sin previa deshidratación.

Las estructuras que posean grupos carbonilos primarios quedan de color rojo a violeta; otros aldehídos pueden dar colores diferentes.

Los leucoderivados equivalentes. — No se conservan tan bien como el reactivo de Schiff. Se preparan de la misma forma pero reduciendo la concentración del colorante a 0,1 g para los cuatro derivados de la acridina.

La siguiente tabla corresponde a Kasten (1957):

Núm. (Color Index)	*Nombre corriente*	*Familia*	*Color de la reacción*	*Fluorescencia*
46 025	Amarillo de acridina	acridina	amarillo-verde	+
46 000	Tripaflavina	—	amarillo	+
46 045	Fosfina	—	amarillo	+
50 040	Rojo neutro	azina	pardo	○
50 200	Fenosafranina	—	rojo	○
50 240	Safranina	—	rojo	○
11 320	Crisoidina rojiza	azoico	anaranjado	○
21 010	Pardo Bismarck rojizo	—	pardo	○
51 010	Azul de cresil brillante	oxazina	azul	○
41 000	Auramina	fenil metano	amarillo	+
42 535	Violeta de metilo	—	violeta	○
42 555	Cristal violeta	—	azul-violeta	○
42 685	Rosanilina ácida trisulfonada		rojo	○
52 000	Tionina	tiazina	azul	○
52 005	Dimetil tionina	—	azul	○
52 015	Azul de metileno	—	azul-verdoso	○
52 040	Azul de toluidina	—	azul-verdoso	○
45 010	Pironina azulada	xanteno	rojo	+
45 210	Rodamina amarillenta	—	rojo	+

Los complejos de plata amoniacal. — Es el denominado método «argentafin» que se estudia con detalle en la página 255.

Las aminas aromáticas. — Benzidina y ortodianisidina.

Preparar una solución al 1 % de la amina en el ácido acético puro; tratar 3/4 h a 50°; lavar con ácido acético; lavar con agua destilada 10 min; eventualmente, tinción de contraste; montar.

Los aldehídos se condensan con estas aminas formando trímeros de aldiminas teñidas de color pardo.

Ácido azobenceno fenil hidracina sulfónico. — Puede sustituir ventajosamente el reactivo de Schiff en la reacción nuclear: da una reacción roja intensa.

Parafenileno-diamina + agua oxigenada. — Tratar durante 15 min en una solución mezcla a partes iguales de: parafenileno diamina al 1 % en agua destilada hervida (conservar en la oscuridad) + agua oxigenada de 1,5 vol.; lavar con agua destilada renovada, virar con cloruro de oro al 1 % durante 5 min; lavar; deshidratar; montar.

Los aldehídos se vuelven de azul-violeta a negro.

Tinción de los fenoles naturales y artificiales

Que sean compuestos naturales o artificialmente introducidos en vistas de una reacción, la tinción de los fenoles reviste una gran importancia en histología animal y vegetal.

La azorreacción. — Es la condensación de sales de diazonio con fenoles para formar colorantes azoicos. Más de cincuenta aminas han sido propuestas para esta reacción. Algunas deberán eliminarse dado que tiñen muy débilmente o de forma poco definida; otras que contienen dos grupos pueden reaccionar con ambos y el resultado ser impreciso en las coloraciones resultantes, aunque éstas sean más profundas y más intensas.

Nomenclatura de las sales y sus aminas correspondientes, selección de las más eficaces, según Lillie (1959):

Núm.	*Nombre de la amina*	*Nombre común propuesto*	*Sinonimias*
37 245	4,4'-diaminodifenilamina	Negro intenso azulado	sal negra BS
37 190	2,5-dimetoxianilina acoplado con el diazo de *p*-nitroanilina	Negro intenso	sal negra NK
37 235	*o*-dianisidina	Azul intenso azulado	sal azul BNS; azul de dianisidina; azul diazo B; sal azul sólido BN; azul naftanil B
37 175	4'-amino-2,5-dietoxibenzanilida	Azul intenso azulado	azul BB, 2BS, NBB; azul diazo sólido BB; azul sólido 2B; EB, BBN
37 155	4'-amino-2,5'-dimetoxibenzanilida	Azul intenso rojizo	azul RR; azul diazo RR; azul diazo sólido NRR, RR
37 255	N-(*p*-metoxifenil-*p*-fenil-enediamina)	Azul intenso azul-violáceo	azul V, B, VB, NS, NSV; azul sólido NB, BL; sal azul variamina BD; azul variamina B, BD, NB
37 135	2-nitro-*p*-anisidina	Bordeaux intenso	bordeaux GP; bordeaux Ciba IV; bordeaux sólido GDN, GPN, GPS, NGP, 3NA
37 020	3,5, dicloro-*p*-fenilene-diamina	Pardo intenso rojizo	pardo RR
37 200	4-metil-*m*-anisidina acoplada con el diazo 2-cloro-4-nitro-anilina	Pardo intenso violáceo	pardo sólido VA
37 150	4'-amino-5'-cloro-*o*-benzanisidina	Corinto intenso	corinto LB; corinto diazo sólido LB
37 195	2,5-dimetoxianilina acoplada con el diazo 2,6-dicloro-4-nitroanilina	Azul oscuro intenso amarillento	azul marino RN
37 210	*o*-toluidina acoplada con el diazo de *o*-toluidina	Granate intenso GBC	granate GBC; bordeaux II
37 015	*m*-toluidina acoplada con el diazo de *m*-toluidina	Granate sólido GC	granate sólido AC, GCD; granate sólido GC
37 025	*o*-nitroanilina	Anaranjado intenso amarillo rojizo	sal de naranja sólido GR
37 275	1-aminoantraquinona	Rojo intenso	rojo diazo sólido AL, rojo naftanil diazo AL; rojo AL, ALS
37 125	4-nitro-*o*-anisidina	Rojo intenso azulado	rojo sólido 5NA, BN, E; rojo V, B, BS; rojo diazo sólido B

Preparación del reactivo. — La amina a diazotar está disuelta en 50 ml de agua destilada, se añaden de 4 a 8 ml de ácido clorhídrico concentrado y se enfría sobre el hielo; a continuación se añaden de 3 a 6 ml de solución acuosa al 5 % de nitrito de sodio a la misma temperatura. Se agita y se deja reposar a 5° durante 15 min antes de su empleo. El reactivo únicamente se conserva de uno a dos días.

Para diazotar la pararrosanilina se puede trabajar a temperatura ambiente de la siguiente manera, según Davis (1959): disolver 1 g de pararrosanilina clorhídrica en 25 ml de ClH, 2N; disolver separadamente 1 g de nitrito de Na en 25 ml de agua destilada; antes de utilizar mezclar tres partes iguales de estas dos soluciones con la sosa normal; agitar y emplear inmediatamente.

Se pueden emplear sales de diazonio del comercio pero teniendo presente que generalmente están estabilizadas con la adición de metales tales como el aluminio bajo forma de sulfato. Estas sales metálicas molestas pueden eliminarse por filtración sobre resinas de intercambio de iones.

Las velocidades de acoplamiento son muy variables, depende de los compuestos que se hallan juntos.

La reacción feocrómica o cromafin o enterocromafin. — Podemos limitarnos a fijar con un fijador que contenga cromo y efectuar una «poscromización» durante 5 días en una solución de dicromato potásico al 3 %. Los compuestos fenólicos quedan teñidos en amarillo o en pardo.

Tinción de los tejidos que contienen lípidos

Pueden presentarse dos casos: si cuando se observan células vivas se aprecian inclusiones lipídicas refringentes, de aspecto característico, es debido a que los lípidos se hallan en fase homogénea hidrófoba; si por el contrario no se observan dichas inclusiones quiere decir que ha habido una extracción de lípidos por parte de disolventes de los mismos, dejando únicamente residuos, se trata de lípidos «heterofásicos», lo cual significa que están asociados a otros componentes o bien que se hallan enmascarados por otros componentes celulares.

En el primer caso, el de los *lípidos homofásicos*, deberá evitarse el empleo de fijadores que contengan alcohol, cloroformo, acetona u otros disolventes de los lípidos, por ello posiblemente el más recomendado sea el formol en solución acuosa al 10 %, bien sea neutralizado o bien habiéndole añadido un exceso de carbonato cálcico en polvo, o bien formol de R. Maire: neutralizado y con cloruro sódico al 0,7 % o incluso mejor formol neutralizado y azucarado de Locquin, que lleva incorporado un 2 % de sacarosa. En todos los casos la concentración final del formol es del 10 %. Cortar por congelación.

En el segundo caso, en el de los *lípidos heterofásicos*, se utilizará formol al 10 % tamponado o neutralizado con acetato cálcico, un 2 % habiéndole adicionado o no un 2 % de sacarosa y se procederá a una «poscromización» por una solución acuosa al 3 % de dicromato potásico, actuando durante varios días. Se puede acelerar calentándolo a 60°. A continuación debe lavarse cuidadosamente con agua corriente durante unas 12 horas. Cortar por congelación o bien incluir en parafina. Cuando deben estudiarse los fosfolípidos del tejido nervioso deberá incluirse en celoidina.

Tinción con lisocromos. — Los *colorantes lisocrómicos* son antraquinonas, azoicos, trifenilmetanos o bien algunos fluorocromos bencénicos. Los clasificamos atendiendo a su intensidad decreciente de tinción: el Sudán negro, el azul BZL, el rojo liposoluble anaranjado, el Sudán IV, el rojo Sudán, el rojo permanente, el azul liposoluble, el Sudán verde, el Sudán Violeta, el Sudán azul, el rojo coccinela, el azul de cresil amoniacal, etc. Los primeros colorantes de la serie pueden utilizarse como vitales de las grasas, especialmente en células vegetales y de hongos. Aunque todos ellos son muy poco hidrosolubles, la adición de algunos cristales a la preparación acuosa, recién preparada, permite una lenta difusión y una captura por los lípidos figurados homofásicos que de esta manera se van tiñendo progresivamente. Esto no es posible cuando los tejidos están fijados. Se utiliza entonces etanol de 70° o una solución sobresaturada de isopropanol, Lillie y Ashburn (1943), o una solución en ácido láctico, Le Gall (1945), o una solución en lactofenol o en cloral-lactofenol de Locquin (1946).

Siempre es interesante trabajar con una solución saturada o sobresaturada, preferentemente decantada o filtrada en el momento del empleo, sea cual fuere el disolvente. Cuando se aprecia una ligera tinción de fondo debe blanquearse, sometiendo el material a varios lavados con etanol de 70°. La tinción con azul de cresil se hace de la siguiente manera: dejar actuar una solución acuosa al 1-2 %, después se lava con amoníaco diluido al 50 %; los lípidos aparecen de color amarillo oro, los tejidos vegetales y fúngicos permanecen incoloros o adquieren una tonalidad rosada. La ventaja de este procedimiento es la de poder observar *in situ* la metacromasia, Locquin (1953).

Si quiere hacerse una tinción de contraste con los lisocromos, se teñirá con hemalumbre diluido al tercio acuoso, o con una laca alumínica de rojo nuclear sólido diluido en agua al 5 %. Se lava cuidadosamente con agua destilada y se procede a

montar en un medio acuoso o bien en agua. La tinción es permanente, dura varios años.

Cuando se tiñe con una solución sobresaturada se procede de la siguiente manera: se prepara una solución madre con alcohol isopropílico de 99° y antes de usar se diluye cogiendo 6 volúmenes de esta solución con 4 volúmenes de agua. Esta dilución provoca una lenta precipitación del colorante sobre los lípidos; el exceso será eventualmente extraído con un lavado rápido con etanol. Lavar y montar como en el caso anterior.

Debe tenerse en cuenta que los líquidos que contienen fenol destruyen la birrefringencia de los lípidos mientras que los colorantes lisocrómicos la refuerzan.

Los *lisocromos fluorescentes* más utilizados son: la fosfina, el 3-4 benzopireno, el antraceno. La fosfina se utiliza en solución acuosa al 0,1 %; se lava rápidamente con agua; se monta con glicerina y se observa iluminando la preparación con rayos UV: la fluorescencia es blanca. Los otros dos fluorocromos se emplean en solución muy diluida, conteniendo el agua un 0,75 % de cafeína y se conserva en frascos oscuros durante algunos meses. El tiempo de actuación es de unos 20 min, se monta en agua; la fluorescencia transitoria es de color azul celeste.

Tinción con el azul de Nilo. — Dado el carácter ácido de algunos lípidos, el azul de Nilo (¡y no de NIL!) es retenido por las estructuras y las tiñe de color azul, mientras que las grasas neutras quedan de color rosado. El tiempo de tinción es de unos 5 min a 60° en azul de Nilo acuoso al 1 %. Se lava rápidamente con agua a la misma temperatura y después con ácido acético al 1 %, igualmente en caliente. Se monta en un medio miscible en agua, Cain (1947).

Tinción con los azules metacromáticos. — Los más utilizados son: la tionina, el azul de toluidina, el azul o el violeta de cresil (pero no el azul de metileno), en solución acuosa al 1 % en el ácido tartárico al 0,5 %. Se monta en el mismo líquido cementando para evitar la evaporación. Esta tinción no solamente pone en evidencia los lípidos ácidos, sino también todos los restantes componentes metacromáticos.

Arvy (1958) mezcla un rojo lisocromo con el azul de toluidina para amortiguar el metacromatismo de los lípidos, teñidos intensamente de color rojo por el lisocromo, mientras que las otras estructuras y las metacromáticas quedan de color rosado. En el momento de usar debe mezclarse la solución lisocrómica con el alcohol isopropílico con azul de toluidina al 0,5 %.

Locquin (1956) prefiere anular la metacromasia de los tejidos con un lavado previo en amoníaco al 50 %; los líquidos quedan teñidos de color amarillo dorado.

Tinción con aftalocianinas. — Klüver y Barera (1953-54) tiñen los lípidos con azul de Luxol sólido según la técnica que indicaremos a continuación, aplicándola sobre cortes de parafina: teñir de 6 a 18 h en una solución al 0,1 % de azul Luxol o de metasol sólido 2G a 60° en etanol de 95°. Lavar con etanol de 70°, después con agua; diferenciar bajo el microscopio con una solución acuosa al 0,05 % de carbonato de litio, lavar con agua corriente, hacer una tinción de contraste con carmalumbre o con rojo nuclear sólido (laca alumínica), deshidratar, aclarar con benceno, montar en una resina.

Si en lugar de esta tinción de contraste se utiliza el rojo neutro la coloración se intensifica por un viraje en negro o en pardo-púrpura.

Emplear soluciones nuevas, no utilizándolas más de dos veces.

Tinción con el tetróxido de osmio. — Se distinguen dos tipos de ennegrecimiento por el tetróxido de osmio: el ennegrecimiento directo sin intervención de ningún otro reactivo y el ennegrecimiento secundario tras la subsiguiente acción del etanol en el transcurso de la deshidratación. Esta acción es concomitante a la acción fijadora de este reactivo. Se atribuye este ennegrecimiento a la acción reductora de los dobles enlaces de ácidos grasos no saturados.

Tinción por adición de yodo o de bromo. — Se sabe que el índice de yodo mide el grado de instauración de los ácidos grasos. Los derivados dihalogenados que resultan no son estables y liberan fácilmente el halógeno que fija el ion argéntico y éste puede ser revelado con las técnicas empleadas en fotografías. De esta manera, los lípidos quedan teñidos de color negro a pardo atendiendo a su grado de saturación. En todos los casos se procede sobre cortes obtenidos por congelación y fijados con este mismo método. Se tratan los cortes de uno a cinco minutos bien sea con una solución acuosa saturada de cloruro de yodo, bien sea con Lugol altamente diluido, al 10 % o bien con una solución equivalente de bromobromuro; se lava varias veces con agua destilada, a continuación se someten los cortes, durante un tiempo variable, atendiendo al tipo de material, de 1/2 hora a 24 horas, a una solución nítrica de nitrato de plata al 3,5 %; seguidamente se hacen siete lavados con agua destilada y posteriormente se procede al revelado con metolhidroquinona durante diez minutos. Se monta con un medio hidrófilo.

Reacción de oxidación perácida. — El ácido peracético es preferible al ácido perfórmico dado que es más estable. Se procede sobre cortes hidratados tratados durante dos horas con el ácido paracético, lavado durante diez minutos con agua

corriente, después con agua sulfurosa, y un posterior lavado con agua corriente. Montar en un medio hidrosoluble o bien deshidratar y montar en una resina. Después del último lavado se puede proceder a teñir los núcleos con hematoxilina. Los lípidos quedan teñidos de color rojo-púrpura.

Reacción de poscromisación controlada. — Elftman (1954) sitúa los fragmentos ligeramente gruesos, directamente a una solución de bicromato acético formado por: bicromato K: 5 g, acetato de Na al 2,7 %: 7 ml, ácido acético 1,2 ml %: 93 ml y se deja actuar a 60° durante 18 h; incluir, cortar, desparafinar e hidratar, teñir durante 2 h a 60° con hematoxilina acética: hematoxilina 0,1 g en ácido acético al 1,2 %: 98 ml, acetato de Na al 2,7 %: 1,5 ml, ferricianuro de K: 5 mg; lavar, deshidratar, aclarar y montar con una resina. Puede partirse de cortes obtenidos por congelación con lo que se evita la inclusión intermediaria.

Reacción seudoplasmática de plasmalógenos. — Los plasmalógenos son acetalfosfátidos, tienen carbonilos que liberan la hidrólisis y sitúan los ácidos grasos de los lípidos. Esta hidrólisis se produce por el cloruro mercúrico en solución acuosa al 1 %. A continuación se trata el material con el reactivo de Schiff de 5 a 10 min máximo; se lava con agua sulfurosa y después con agua corriente y se monta con un medio hidrosoluble. Esta técnica debida a Hayes ha sido simplificada por Cain, que combina en un solo reactivo los tres precedentes: reactivo de Schiff: 1 vol + solución acuosa saturada de cloruro mercúrico: 2 vol + agua sulfurosa: 1 vol. Se lava, a continuación se fija con formol al 10 %, se corta por congelación y se monta con un medio hidrófilo.

(El agua sulfurosa es una solución de metabisulfito de K al 10 %, al que se le añaden 5 ml de ácido clorhídrico normal.)

Reacción de los carotinoides. — Habitualmente se relacionan los carotinoides con los lípidos debido a sus características de solubilidad. Se tiñen directamente con el Lugol o el Melzer de color violeta, azul o verde en los ácidos fuertes y en violeta con los líquidos yodados. Manifiestan una fluorescencia primaria verde intensa.

Reacción de cromolipoides. — Se trata en general de pigmentos amarillos a pardusco, endo o epicelulares, basófilos o acidorresistentes. Se encuentran tanto en animales como en hongos, Rúsulas y Rodofílidos, principalmente. Romagnesi, basándose en su presencia utiliza este carácter para la sistemática, sin haber analizado su naturaleza. Su acidorresistencia se pone en evidencia con la clásica técnica de Ziehl-Nielsen.

Cortar, desparafinar si es necesario, hidratar. Teñir durante 3 h a 60° con pararrosanilina fénica de Ziehl. Diferenciar bajo el microscopio con alcohol absoluto clorhídrico al 1 % hasta que el fondo adquiera una tonalidad rosa, lavar con agua corriente; teñir los núcleos con una solución al 0,2 % de azul de toluidina; lavar; deshidratar, aclarar y montar en una resina.

Frecuentemente los cromolipoides están combinados con melaninas. Para diferenciarlas deberá recordarse que las melaninas se decoloran con el agua oxigenada, lo que ha dado origen a la técnica de Hueck (1912): Cortar, desparafinar en caso necesario, hidratar, teñir 1/2 h en una solución acuosa saturada de azul de Nilo; lavar; tratar de 12 a 24 h en agua oxigenada de 10 a 30 vol.; lavar; montar en un medio hidrosoluble (cf. también p. 253).

Tinción de proteínas

Cetonización de los carboxilos, método de Barnett y Selgiman. — Se lleva a cabo una acetólisis piridínica con anhídrido acético + piridina en partes iguales durante 1 h a 60°; se lava con etanol absoluto y seguidamente con alcohol de 50°; después se lleva a cabo una azorreacción, tratando inicialmente durante 2 h con la solución siguiente: hidracida 2-hidroxi-3 naftoico: 50 mg + ácido acético: 2,5 ml + etanol de 50°: 47,5 ml; lavar con etanol de 50°; tratar 1/2 h con ClH, 0,5 N, lavar con agua y después con agua bicarbonatada al 1 %; lavar con agua destilada; colocar las preparaciones en 50 ml de etanol absoluto + tampón fosfato a pH 7,6 a partes iguales; añadir, agitando, 5 mg de diazodianisidina; dejar actuar 5 min; lavar con agua destilada y montar en un medio preferentemente hidrófilo.

La reacción se aprecia por una tonalidad roja o azul.

Siderofilia: método de Hartig-Zacharias. — Preparar justo antes de usar una solución al 5 % de ferrocianuro de K en ClH al 1 %; tratar con ella los cortes durante 10 min; lavar varias veces con agua y a continuación 2 min con una solución de cloruro férrico al 1 % en agua destilada; eventualmente teñir los núcleos con una laca alumínica de rojo nuclear sólido; deshidratar, montar con una resina.

Una observación al microscopio, antes de tratar los cortes con el cloruro férrico, revela el hierro como un precipitado de color azul de Prusia; después son las estructuras que han retenido el ferrocianuro las que se tiñen en azul.

Tanofilia: método de Locquin (1942). — Preparar una solución de tanino al 5 % en el etanol de 50° acetificado al 10 %; tratar 20 min en frío o

1 min en caliente con esta solución; lavar en agua destilada; tratar 1 min con una solución de alumbre de hierro al 1 %; lavar; montar en un medio hidrófilo.

La tanofilia que es también una siderofilia se traduce por una coloración negra intensa.

Aminofilia: método de Tranzer y Pearse. — Deshidratar con etanol absoluto; tratar 20 h en la mezcla: 2,4-dinitrofluorobenceno 1 + etanol absoluto: 100 ml + NaOH, N: 0,2 ml; lavar con varios baños renovados de etanol de 95°; lavar con agua; tratar 20 min a 37° con una solución al 20 % de tricloruro de titanio con un 15 % de tampón citrato a pH 4,5; lavar con este tampón y después con agua destilada; diazotar durante 5 min sobre el hielo con una mezcla de 8 ml de nitrito de Na al 5 % + ácido sulfúrico N: 1 ml; lavar con agua a 4°; tratar 5 min a 4° con una solución saturada en un tampón de acetato de Na-veronal sódico del ácido 1-amino-8 naftol-3,6-disulfónico a pH: 9; lavar con agua corriente: deshidratar; montar.

Reacción positiva: rojo-púrpura.

Desaminación oxidativa: Reacción de la ninhidrina-Schiff. — Tratar durante 20 h a 37° en una solución al 0,5 % de ninhidrina en etanol absoluto; preparado justo antes de usar; lavar; tratar con el reactivo de Schiff durante 1 h; lavar con agua sulfurosa y después con agua corriente; teñir eventualmente los núcleos con la hematoxilina de Groat; lavar; deshidratar, montar.

Tinción rojo-magenta.

Regeneración de los Zinc-leucos; Lison (1931). Aplicable para detectar las metaloproteínas. Preparar el leucoderivado del colorante adecuado de la siguiente manera: mezclar colorante: 1 g + Zn en polvo: 10 g + agua: 100 ml + ácido acético: 2 ml; hervir hasta que la solución adquiera una tonalidad amarillo paja; conservar sobre el polvo de Zn, añadiendo 2 ml de ácido acético; se conserva más o menos según los colorantes utilizados; puede ponerse un poco de cloroformo o de Zn en granos en el fondo del recipiente y agitar de vez en cuando.

Los colorantes recomendados para la obtención de Zinc-leucos son:

Rosanilina ácida trisulfonada; Azul patente; cianol; diversos violetas ácidos.

Tratar con una mezcla, preparada antes de usar, de Zinc-leuco: 10 ml + agua oxigenada de 12 vols.: 1 ml; lavar; deshidratar; montar.

Color azul o verde intenso.

Tinción con el carmín-alumínico-cianol de Fautrez y Lambert. — El carmín alumínico y el carmalumbre únicamente difieren algo por la manera de prepararlos y, en su concentración, puede utilizarse indistintamente uno u otro.

Preparar el reactivo de la siguiente manera: carmalumbre: 10 ml + solución acuosa de cianol al 1 %: 10 ml + tampón de McIlvaine a pH 6,4: 10 ml; teñir de 1 a 24 h en frío o durante 1 o 2 min en ebullición, dejar enfriar; lavar con tampón; diferenciar algunos segundos con etanol de 70°; deshidratar y montar.

Se puede intensificar la tinción haciendo virar a negro al añadir, durante la ebullición, una gota de tanino férrico en solución acuosa al 1 %, según Locquin.

Tinción de los tejidos que tienen poliósidos

Si entrar en demasiados detalles químicos digamos que los azúcares más o menos polimerizados pueden dividirse en seis grandes categorías.

— Los *poliósidos* = polisacáridos sencillos = hidratos de carbono;

— los *mucopoliósidos neutros*, con grupos hexosamina;

— los *mucopoliósidos ácidos*, con acetilhexosamina y *ácidos* como el *ácido hialurónico,* el *pirúvico* o el *sulfúrico*;

— las *mucoproteínas* con más de un 4 % de nitrógeno;

— las *glucoproteínas* con menos de un 4 % de nitrógeno;

— los *glucolípidos* o cerebrósidos.

Tinción metacromática o metacromotropa. — Esta reacción consiste en un viraje del colorante cuando ha sido captado por la estructura, adquiriendo otra tonalidad. Indica la presencia de grupos electronegativos, densamente distribuidos, tales como los que están presentes en los mucopoliósidos ácidos (= mucopolisacáridos ácidos). Se utilizan en orden de interés decreciente: el azul de toluidina, la dimetil tionina, la tionina, el cristal violeta, el pinacianol, la safranina, el violeta de metilo, el azul celestina, el pardo Bismarck amarillento, el azul de cresil, la gallocianina, el azul de metileno, este último sólo actúa debido a sus impurezas. La elección preferencial por uno u otro es cuestión de moda o de rutina, así el azul de cresil es muy utilizado en micología. A nuestro juicio, todos ellos pueden ser reemplazados por el azul de toluidina, el cual da una metacromasia rojo-carmín más intensa que cualquiera de los mencionados.

Estos colorantes se usan en solución acuosa, muy diluida, del orden del 0,01 % o bien más concentrada, del orden del 0,5 %, en agua pura o bien en agua que contenga un 0,5 % de ácido tartárico o en un tampón fosfato o acético, de pH comprendido entre 3 y 5. Las soluciones diluidas presentan la ventaja de permitir estudiar al mi-

croscopio la progresión de la tinción lo que generalmente ofrece informaciones muy interesantes sobre la diferente permeabilidad de determinadas estructuras complejas, difíciles de analizar por otros sistemas, como es el caso de las esporosporas de las esporas de algunas especies de setas, o los aparatos apicales de algunas ascas. Una vez alcanzada la tonalidad deseada, se lava abundantemente con agua hasta que no haya eliminación del exceso de colorante. En el caso de no montar en un medio hidrosoluble, se podrá observar el efecto del alcohol sobre la metacromasia obtenida, pudiendo en algunos casos incluso desaparecer. Hasta cierto punto esto puede evitarse, si en la deshidratación se utiliza el alcohol butílico terciario o bien tratando los cortes, después de haberlos teñido, con molibdato amónico en solución acuosa al 5 %. Se puede apreciar muy bien, aparte de la tinción ortocromática α azul, dos intensidades distintas de metacromasia; β violeta, γ rojo-púrpura, a la que añadiremos una tercera en el caso de los hongos, la granate-rojo pálido. A nuestro juicio, la metacromasia es siempre una mezcla con la ortocromasia y β, γ y δ no se distinguen más que por la densidad de los grupos con los que reaccionan.

Tinción después de oxidación: Ácido periódico-Schiff, APS o PAS. — El ácido periódico en solución acuosa al 0,5 % o alcohólica al 1 % o nítrica al 1 %, oxida los poliósidos: los aldehídos así liberados son puestos de manifiesto con el reactivo de Schiff. De esta manera, se ponen de manifiesto los siguientes poliósidos: polisacáridos, glucógeno, galactógeno, almidón, celulosa, tunicina, dextrano, mucopoliósidos neutros, quitina (no esclerificada, ni fosilizada), mucus gástrico, mucopoliósidos ácidos, mucinas, ácido hialurónico, heparina, mucoproteínas, hormona tireotropa y tiroglobulina, gonadoestimulinas; mucoides; glucoproteínas, gelatina, ovoalbúminas, seroalbúmina, colágena, reticulina; glucolípidos, cerebrósidos, esfingomielina, cardiolipina, cefalina, lipofucsina; cromolípidos, pigmentos melanoides.

Oxidar de 5 a 10 min en ácido periódico; lavar 5 min en agua, teñir con el reactivo de Schiff de 10 a 30 min; lavar con agua corriente o sulfurosa; teñir los núcleos con hematoxilina (cf. p. 242); tinción de contraste con el picrocarmín de índigo durante 10 s; lavar, deshidratar, aclarar y montar en una resina. Los *poliósidos* quedan teñidos de color rojo a violeta-rojizo; los *núcleos* en negro; las *proteínas acidófilas* de color amarillo claro.

Una variante alocrómica de Lillie sustituye el picrocarmín de índigo por el picroazul de metilo al 0,4 % actuando durante 6 min, con lavado en etanol de 96°.

Tinción tras esterificación. — La esterificación sulfúrica o fosfórica de Bignardi (1940) libera y detecta la función alcohólica que fija un grupo altamente electronegativo, cuya basofilia y metacromasia son posteriormente teñidas.

Las mezclas esterificantes más sencillas a emplear son:

— la mezcla en partes iguales de ácido sulfúrico + anhídrido acético;

— la mezcla a partes iguales de ácido sulfúrico + ácido acético;

— el cloruro de sulfurilo en fase gaseosa.

Se deja actuar de 5 a 20 min, después se tiñe durante 30 min en un colorante azul, metacromático o no, por ejemplo con el azul de metileno fosfoclorhídrico: fosfato monopotásico M/10: 8 ml + ClH N/10: 4 ml + azul de metileno al 1 %: 2 ml + agua destilada: 26 ml; lavar con agua; pasar por acetona para deshidratar en dos etapas: primero con acetona de 50° y después con acetona pura; aclarar, montar en una resina.

Siderofilia coloidal. — La siderofilia es la capacidad que presentan algunas estructuras de fijar el hierro coloidal. Se utiliza, bien sea el sacarato de hierro coloidal al 0,5 % acetificado al 1 %, o una solución de cloruro de hierro al 3 %, hervido, acetificado al 10 % en el momento de usarlo; o también puede prepararse por trituración por ebullición acética de una aguja de hierro. Se trata, en frío, durante 10 a 30 min, o bien en caliente durante 1 a 2 min, se lava con agua acetificada al 10 %, después se fija durante 10 min con una solución acuosa recién preparada de ferrocianuro potásico al 1 % y clorhídrico al 1 %. Se forma el azul de Prusia.

Tinción con las aftalocianinas cúpricas. — Los más utilizados son el azul alcián, el verde alcián, el amarillo alcián, el azul astra. A un pH inferior a 3 tiñen los mucopolisacáridos; tratar con una solución acuosa al 0,5 % en ácido acético al 3 % durante 10 min a 2 h; lavar con agua destilada. Teñir eventualmente los núcleos con hematoxilina y el fondo con picro-pararrosanilina; deshidratar; aclarar; montar en una resina. Puede combinarse ventajosamente el azul alcián con el amarillo alcián: si previamente se efectúa una oxidación con ácido periódico se teñirán igualmente los polisacáridos ácidos.

Tinción tras acetilación o metilación reversibles. — La acetilación o la metilación de los grupos hidróxilos o de alguno de ellos se denomina «reversible» cuando la acción de la potasa diluida vuelve a establecer el estado inicial observable por la reactividad del PAS.

Para ello se utiliza la piridina acética: piridina: 20 ml + anhídrido acético: 13 ml o alcohol metílico clorhídrico; metanol: 100 ml + ClH: 0,8 ml, actuando a 40-60° durante 3 h o más; se pasa al agua; se lava con alcohol amoniacal al 20 % un

par de cortes control, para restablecer por saponificación el estado inicial. Estos dos cortes son seguidamente teñidos con azul alcián. Interesa teñir paralelamente los cortes testigo con el PAS o con el azul alcián para poder comprobar, por comparación, lo que ha desaparecido. Para mayor detalle consúltese el Gabe (1968), página 428, y siguientes. Además de su interés histoquimiotopográfico estas reacciones de acetilación o metilación son habitualmente empleadas en palinología para la preparación de esporas y granos de polen. Hay un gran interés por efectuar un estudio bioquímico sistemático basándose en la reversibilidad descrita más arriba.

Tinción con rojo de rutenio. — Se utiliza el rojo de rutenio en solución acuosa al 0,1 % o en solución con el alumbre al 10 % igualmente acuoso.

Colorantes de las oxidasas

En 1885 Ehrlich puso de manifiesto la «citocromoxidasa» inyectando en los tejidos una mezcla de alfa-naftol y de dimetilparafenileno-diamina. Creando de esta manera la *«Nadirreacción»* que permite localizar las oxidasas en los tejidos. El resultado de la reacción da, por oxidación, un producto de condensación teñido de azul: el azul de indofenol. No debe efectuarse una fijación previa, el colorante formado difunde fácilmente y es un lisocromo.

A continuación, recomendamos una serie de técnicas a utilizar tanto en histología vegetal como animal. La especificidad histoquímica queda garantizada únicamente en el caso de tomar una serie de precauciones de manipulación que son precisadas en el Gabe (1968).

Si sólo se pretende poner de manifiesto topológicamente y de forma comparada, basta con evidenciar uno de los dos compuestos fundamentales de la nadirreacción *in situ*, especialmente en los tejidos vegetales y de forma particular en los hongos. Es lo que muchos micólogos hacen tiñendo determinados tejidos de las rúsulas o boletos con ayuda del fenol. Los mismos micólogos utilizan también la misma reacción cuando emplean el parafenileno-diamina o el tinte de Gaïac.

Cuando en los tejidos únicamente existen las oxidasas sin ir acompañadas de fenoles ni de diaminas, hay que introducir previamente estos dos reactivos. A continuación se indica cómo:

Técnica de Moog. — Impregnar durante algunos minutos a temperatura ambiente o del cuerpo del animal una mezcla acabada de preparar y formada por: tampón Sörensen a pH 7,2 a 7,6: 25 ml + solución etanólica a 40° de α naftol: 1 ml + solución acuosa al 1 % de clorhidrato de dimetil-parafenileno-diamina: 1 ml. Observar al microscopio cómo progresa la reacción: detenerla lavándola con agua o con suero fisiológico; montar en un medio hidrosoluble. Tinción azul.

Una metaloproteína oxidasa que contiene cobre o manganeso es la responsable de la melanogénesis tanto en los vegetales como en los animales (parece que el manganeso es más frecuente que el cobre en los hongos).

La oxidación de la tirosina en DOPA (dioxifenilalanina) es debida a una enzima asociada a un ortodifenol y a iones metálicos. El descubrimiento de esta reacción se debe a Bloch (1917). Hay que proceder de la siguiente manera: fijar con formol neutro al 10 % durante 1 h; cortar en fragmentos de 2 mm de grosor; lavar con agua durante 5 min; impregnar durante 1 hora a la temperatura corporal del organismo con una solución al 1 por mil de dihidroxifenilalanina en tampón Sörensen 0,1 M a pH 7,4; cambiar el líquido; proseguir durante 12 a 24 h; lavar 10 min con agua; volver a fijar con el picroformol de Bouin durante 24 h; deshidratar, recortar, pegar y montar en una resina. Los gránulos positivos quedan de marrón a negro. Según Laidlaw y Blackberg la tinción es permanente.

Durante mucho tiempo se han confundido las reacciones de la tirosinasa con las de las polifenoloxidasas. Estas últimas son principalmente características de los tegumentos y de los peridios. La fijación se hace con formol o con alcohol. Se impregna con una solución acuosa de pirocatecol al 0,2 %; se lava con agua durante media hora; se monta en una resina tras previa deshidratación: tinción de pardo a rojo de las polifenoloxidasas.

En presencia de agua oxigenada algunas enzimas peroxidasas transfiriendo el hidrógeno de los fenoles y de las aminas aromáticas en Zin-leucos. Se trata pues de las mismas reacciones anteriores pero efectuadas en presencia de agua oxigenada.

Para poner de manifiesto las deshidrogenasas, consúltese el Gabe (1968).

Tinción de los ácidos nucleicos

Manifestación de la basofilia por las tiazinas. — Preparar una solución de azul de toluidina a pH 4,2 al 0,2 % en tampón Walpole; teñir durante 5 min; lavar con tampón; deshidratar con alcohol butílico terciario y montar.

Tinción con la laca crómica de gallocianina. — Disolver 0,15 g de gallocianina en 100 ml de una solución acuosa al 5 % de alumbre de cromo; someter durante 10 min a ebullición; dejar enfriar, filtrar, completar hasta 100 ml; se conserva durante varios meses. Teñir con esta laca de 24 a 48 h; lavar; deshidratar; montar. Los núcleos quedan de color azul-negro.

Tinción con el verde de metilo purificado. — Extraer el violeta de metilo que es una impureza que se forma espontáneamente en el colorante conservado en polvo, para ello debe agitarse el polvo en cloroformo; renovándolo hasta que deje de dar coloración violeta; decantar, dejar secar y seguidamente disolverlo en agua, donde se conserva muy bien. Para teñir úsese una solución al 1 %. Conservarlo en un frasco de plástico bien cerrado. Se mezcla 25 ml de la solución con fenol: 0,5 g + glicerina: 0,5 g + etanol de 96°: 25 ml + agua destilada: 100 ml. Teñir durante 15 min; lavar con agua destilada fría; secar; deshidratar pasando el material por dos baños de alcohol butílico terciario, 6 h en cada uno de ellos; montar.

Tinción diferencial de la basofilia por el método de Pappenheim-Unna. — Purificar con cloroformo como en el caso anterior del verde de metilo. Preparar la siguiente mezcla: verde de metilo: 0,15 g + pironina amarillenta: 0,25 g + fenol: 0,5 g + glicerina: 20 ml + agua: 100 ml. Conservar protegido de la luz. Teñir durante 5 min; escurrir, deshidratar rápidamente; montar. *Núcleos* verdes, *nucléolos* rojos.

Reacción nuclear de Feulgen-Rossenbeck. — Hidrolizar a 60° en ClH, N, durante 5 a 25 min según el fijador utilizado; lavar con agua; dejar actuar el reactivo de Schiff de 30 a 60 min; lavar con agua sulfurosa y después con agua. Hacer eventualmente una tinción de contraste con el picrocarmín de índigo; deshidratar y montar. Es el método más frecuentemente elegido.

Tinción tricrómica de Himes y Moriber. — Es una asociación de tres tinciones: nuclear + PAS + dimetil-tionina. Preparar antes de usar: **A)** agua: 90 ml + solución acuosa al 5 % de metabisulfito Na: 5 ml + ClH N: 5 ml; **B)** Dimetiltionina: 1 g en 100 ml de la solución A; **C)** ácido periódico 0,8 g + agua: 90 ml + acetato de Na, solución acuosa 0,2 N: 10 ml; **D)** Reactivo de Schiff, cf. p. 229; **E)** amarillo naftol sulfonado: 1 g + ácido acético al 1 %: 100 ml; antes de usar diluir cincuenta veces con ácido acético al 1 %.

Hidrolizar a 60° en ClH N durante 5 a 25 min atendiendo al fijador utilizado; lavar con agua; tratar con **B** durante 5 min; lavar, tratar dos veces seguidas con la solución **A**; lavar; oxidar con **C** durante 2 min; lavar, tratar con **D** durante 2 min; lavar, tratar dos veces seguidas con la solución **A**; teñir 2 min con **E**; lavar; enjuagar; deshidratar con alcohol butílico terciario; montar.

Yodofilia

Tinción con yodo. — Según la manera de actuar y la tinción obtenida, el yodo permite distinguir el glucógeno, la celulosa, el almidón, la quitina no esclerificada ni fosilizada, y algunos otros poliósidos; dextrinoideos. A continuación ponemos los principales reactivos utilizados:

■ Yodo en forma de vapor (Gilberg). — Calentar algunos cristales de yodo previamente colocados en el fondo de un tubo de ensayo inclinado, se desprenden rápidamente pesados vapores violetas en los que se introducen los cortes hidratados evitando emplear instrumentos metálicos.

■ El Lugol, *fuerte o débil atendiendo a su concentración.* — Yodo 1 g + IK 2 g + agua 100 a 400 ml según la «intensidad» deseada.

■ El Melzer Yodo-Yoduro clorado. — Yodo: 1,5 g + IK 5 g + hidrato de cloral 100 g + agua 100 ml.

■ La glicerina Yodo-mercúrica. — Yodo: 50 g + yoduro potásico: 100 g + I_2Hg: 65 g + glicerina: 250 g. Este medio tiene un índice de refracción muy elevado, por lo que tiene gran interés su utilización.

■ El xilol-yodo-mercúrico. — I_2Hg al 2 % en etanol absoluto, con trazas de IK: 1 vol. + xilol: 9 vols. + trazas de yodo.

■ Aceite de vaselina saturado de yodo.

■ El Lugol post-sulfúrico. — A la acción del Lugol le sigue un tratamiento con SO_4H_2 2/3 + agua 1/3.

■ Yodo-cloruro de zinc. — Tratar con una mezcla formada a partes iguales de yodo: 6,1 g + yoduro K 10 g + 14 ml de agua y de Cl_2Zn: 60 g + 14 ml de agua. Prepárese antes de usar.

■ El cloruro de yodo en solución acuosa saturada.

Debe observarse detenidamente el color y la intensidad de la tinción. Según los casos, puede obtenerse un color negro intenso, violeta oscuro, azul oscuro, azul celeste, caoba, rojizo vino, amarillo pardusco, amarillo dorado, amarillo claro. Estos tres últimos colores generalmente no indican diferencias de compuestos. Si las estructuras toman un color que va del caoba al pardo-rojizo se dice que son «dextrinoides» o seudo-amiloides. Pueden estar formados por glucógeno o dextrinas. Si se tiñen de color violeta con el yodo-cloruro de zinc puede tratarse de celulosa o de quitina; únicamente la celulosa toma una tonalidad azulada con el Lugol possulfúrico; el almidón y el amiloide se tiñen directamente de azul con el Lugol o con el Melzer; esta reacción se denomina amiloide.

No sabemos si la reacción denominada de la misma manera en citología micológica es químicamente igual.

La seudoquitina de los Quitinozoarios es una quitina que ha perdido ya algunas de sus propiedades químicas por el hecho de su fosilización en el transcurso de centenares de millones de años.

La tinción con el yodo es una auténtica coloración metacromática en contraposición de los colores amarillentos ortocromáticos que adquieren la mayoría de las estructuras sometidas a la acción del yodo.

Debe tenerse en cuenta que la fijación del yodo sobre las estructuras aumenta su índice de refracción y también incrementa la birrefringencia de los compuestos. Además, el yodo introduce un dicroísmo muy útil cuando se trata de estudiar polímeros.

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

5/
TINCIONES TOPOLÓGICAS

I. — MÉTODOS PANÓPTICOS GENERALES

TINCIÓN DE NÚCLEOS CON LACAS PROGRESIVAS DE HEMATOXILINA

Se sabe que la hematein a, obtenida por oxidación de la hematoxilina, combinada con sales de aluminio, de hierro o de cromo, es el agente activo de una tinción *progresiva* específica de núcleos. La costumbre ha impuesto el término de hematoxilina, cuando lo correcto sería hablar de hematein a. Efectivamente, la hematoxilina es la materia prima, extraída del palo de campeche, mientras que la hematein a es el agente químicamente activo.

A. — **Preparación del principio activo, la hemalumbre: para las lacas alumínicas.** Puede partirse de la hematoxilina y oxidarla con permanganato potásico según la técnica de Hansen (1891), sin embargo es mucho mejor partir de la hematein a, actualmente muy fácil de conseguir.

Disolver 0,2 g de hematein a en 100 ml de solución acuosa saturada de alumbre potásico, hervir, dejar enfriar y filtrar.

Tinción con el hemalumbre. — Laca alumínica de hematein a, tinción progresiva.

Teñir de 2 a 5 min; lavar con agua del grifo; controlar al microscopio; si es necesario volver a teñir con la misma solución; en caso de sobretinción desteñir con alumbre K al 2 %; lavar 5 min con agua del grifo. Si se desea puede efectuarse una tinción de contraste; deshidratar y montar.

Núcleos: de azul a violeta oscuro; *ergastoplasma:* azul; *inclusiones cálcicas:* azul; *mucinas, polisacáridos ácidos, granos de secreción:* azul.

B. — **Preparación del principio activo, la trioxihematein a férrica,** para las *lacas férricas* en medio acuoso.

Disolver, en caliente, 10 g de alumbre férrico y 1,4 g de sulfato alumínico en 150 ml de agua destilada, sin que llegue a hervir; separadamente disolver 1,6 g de hematoxilina en 75 ml de agua destilada; dejar enfriar; verter la primera solución en la segunda (hay que seguir este orden) hervir durante 40 s, dejar enfriar; conservar en frío en un frasco herméticamente cerrado, filtrar antes de usar. Si se desea una tinción intensa debe acidificarse el colorante en el momento de utilizarlo añadiendo un 20 % de ácido sulfúrico al 1 %.

Tinción con la trioxihematein a férrica: laca progresiva de hematein a férrica.

Teñir de 2 a 5 min; lavar con agua del grifo; hacer una tinción de contraste, si interesa; deshidratar y montar.

C. — **Preparación del principio activo, la trioxihematein a férrica propiónica** para las lacas férricas en medio acuoso *acidificado con el ácido propiónico.*

A. — Ácido propiónico: 50 ml + agua: 50 ml + alumbre férrico: 0,5 g + acetato férrico.

B. —Hematoxilina: 2 g + ácido propiónico: 50 ml + agua: 50 ml.

Tinción con la trioxihematein a propiónica

Después de la fijación efectuar un lavado de 1 a 2 días con agua; mezclar una gota de **A** con una gota de **B**; teñir durante 12 a 24 h o incluso más después de haberlo controlado al microscopio y haber cambiado la solución. Deshidratar y montar.

Núcleos: Pardo-negruzco a negro. Particularmente recomendado en histología vegetal.

D. — **Preparación del principio activo de la hematoxilina alcohólica:**

A. — Disolver 1 g de hematein a en 10 ml de etanol absoluto, completar hasta 100 ml con agua destilada. En una variante se añaden 10 ml de glicerina antes de completar hasta los 100 ml con agua destilada. **B.** — Solución madre de alumbre de hierro amoniacal al 6 %; debe diluirse a la mitad con agua destilada antes de usarse.

Tinción después de aplicar como mordiente la laca férrica con hematein a (tinción progresiva)

Al salir los cortes del agua aplicar como mordiente la solución **B,** durante 3 a 18 h; lavar durante 2 o 3 días con agua del grifo; teñir durante 12 h con la solución **A**; lavar, deshidratar y montar.

Núcleos: negros. Es particularmente interesante para estudios de criptógamas.

E. — **Preparación de lacas progresivas crómicas de hematein a.**

Preparar el colorante disolviendo, en caliente, 10 g de alumbre crómico en 250 ml de agua, hervir hasta que adquiera una tonalidad verde; disol-

ver 1 g de hematoxilina en 10 ml de agua caliente; verterla en la solución anterior, antes de que se enfríe; dejar enfriar; añadir 0,5 g de ácido sulfúrico y seguidamente 0,55 g de dicromato K disuelto en 20 ml de agua destilada, verter paulatinamente a la vez que se va agitando; hacer hervir durante 3 min; y dejar enfriar.

Tinción con las lacas progresivas crómicas de hemateína

Teñir de 5 a 10 min; con tiempos del orden de 1 h no hay peligro de sobretinción; lavar con agua del grifo; tinción de contraste facultativa; deshidratar y montar.

TRICRÓMICOS O DICRÓMICOS; TINCIONES CITOPLASMÁTICAS ASOCIADAS CON TINCIONES NUCLEARES ASÍ COMO CON TINCIONES ESPECÍFICAS

En toda tinción panóptica debe haber un colorante citoplasmático, armoniosamente combinado con un colorante nuclear y un colorante específico de las fibras de colágena.

Tricrómico de Masson-Goldner. — Preparar los 5 reactivos siguientes: **A)** *Hematoxilina de Weigert,* o *trioxihemateína de Hansen* o bien *hematoxilina de Groat* (cf. p. 306). **B)** 300 ml de agua + Ponceau rubescente: 0,2 g + fucsina ácida: 0,1 g + ácido acético: 0,6 ml. **C)** Agua: 100 ml + ácido fosfotúngstico: 3 g + Orange G: 2 g. **D)** Verde luz: 0,1 g + agua: 100 ml + ácido acético: 0,2 ml. **E)** agua acetificada al 1 %.

Teñir en primer lugar los núcleos con una laca progresiva de hematoxilina; lavar con agua corriente; teñir durante 5 min con fucsina-Ponceau **B**; lavar con agua acetificada **E**; tratar durante 5 min con Orange G-fosfotúngstico **C**; lavar con agua acetificada **E**; teñir 5 min con verde luz **D**; lavar con agua acetificada **E**; deshidratar y montar.

Núcleos: pardo-negro; *citoplasma:* rojo intenso a verdoso; *colágena:* verde; *hematíes:* amarillos.

Tricrómico de Gomori-Gabe. — Preparar los tres reactivos siguientes: **A)** Eosina: 0,6 g + verde luz: 0,3 g + ácido fosfotúngstico: 0,6 g + agua: 100 ml + ácido acético: 1 ml. **B)** Hematoxilina de Weigert, trioxihemateína férrica, o bien hematoxilina de Groat. **C)** Agua acetificada al 0,2 %.

Obtener cortes delgados; desparafinar e hidratar. Teñir los núcleos con una laca progresiva de hematoxilina **B**; lavar con agua del grifo; teñir de 10 a 20 min en la solución **A**; lavar con agua acetificada **C**; deshidratar y montar.

Núcleos: pardo-negro; *citoplasma:* rojo intenso; *colágena:* verde; *hematíes:* amarillos. Las tonalidades son mucho más intensas.

Tricrómico de Gabe-Martoja denominado «tricrómico en un tiempo». Preparar la mezcla formada por amaranta: 0,5 g + ácido fosfomolíbdico: 0,5 g + verde sólido FCF: 0,5 g + agua destilada: 100 ml + ácido acético: 1 ml + amarillo Mars a saturación (dejar reposar 2 h); tiempo de tinción 10 min; lavar; deshidratar y montar.

Es el método más rápido. *Núcleos:* rojos; *ergastoplasma:* rojo; *granos de secreción:* rojos; *citoplasma:* rosa; gris o verde; *estructuras acidófilas:* amarillas; *colágena:* verde.

Puede asociarse con la técnica de la pararrosanilina-diparaldehído para la detección de aniones (cf. pág. 228).

Tricromazán o azán o azocarmín-anilina de Heidenhain. — Preparar las siguientes cinco soluciones, que se conservan bien:

A) Solución acuosa saturada de azocarmín amarillento (para teñir en caliente o de azocarmín azulado para teñir en frío, menos intenso), acetificado al 1 %. **B)** Etanol de 70° anilado al 1 %. **C)** Etanol de 96° acetificado al 5 %. Disolver en caliente azul de anilina: 0,5 g + naranja G: 2 g en 100 ml de agua destilada, dejar enfriar y añadir 8 ml de ácido acético; diluir 2 o 3 veces con agua en el momento de usar.

Teñir durante 1 h con el azocarmín **A** (a 60° en el caso de usar el azocarmín amarillento); lavar con agua destilada; diferenciar al microscopio con alcohol anilado **B**, dejarlo como mínimo 30 s en alcohol acético **C**; lavar 30 min con ácido fosfotúngstico **D**; después con agua destilada; tratar durante 30 min con el azul-naranja **E**; lavar con agua destilada; deshidratar y montar.

Núcleos: rojo intenso; *citoplasma:* amarillo; *colágena:* azul intenso; *mucopolisacáridos:* azul celeste; *granos de secreción:* de rojo a azul; *hueso:* de rojo a amarillento; *fibras musculares estriadas:* de rojo a amarillo.

Tricrómico de Millot. — Preparar: **A:** hemalumbre de Masson; **B**: fucsina ácida al 20 % en agua anilinada en solución saturada; **C**: etanol de 40° saturado de amarillo de Mars. Teñir los núcleos con hemalumbre **A**; lavar con agua del grifo; teñir durante 5 min con la fucsina anilinada **B**; lavar con etanol de 40°; teñir con amarillo Mars hasta adquirir una tonalidad general amarillenta; deshidratar y montar.

Núcleos: azul-violeta; *citoplasma:* amarillo-rojizo; *granos de secreción:* rojo a azul.

Tricrómico de Benda. — Safranina-ácido pícrico-verde luz **A**. Disolver 1 g de safranina en 100 ml de etanol absoluto, completar con 50 ml de agua destilada; **B**: ácido pícrico en solución

PROTOCOLO A SEGUIR

(Tres grandes métodos)

Recoger los organismos → Anestesia → Matar → Extracción del órgano o tejido (rápida) → Fragmentar en trozos de 0,5 cm^2 de superficie → *Fijar* de 12 a 24 h, escogiendo, según el tipo de material el líquido fijador más adecuado:

Mercuro-acético para embriología
Ósmico para citología de precisión
Cromoósmico para orgánulos intracitoplasmáticos
Cromoformol para estudios de condrioma
Dicromo-mercuroformol para estudio de granos de secreción
Uranoformol para el estudio de los dictiosomas golgianos y del condrioma
Formotricromoácido para estudio de cromosomas
Etanol picroformolado ácido para histología, salvo lípidos
Picroformol ácido para la histología general

Lavar con agua durante unas 24 h

↓

Conservar en etanol de 70°

↓

Si el fijador es mercúrico pasar por alcohol yodado

↓

Lavar con etanol de 70°

Conservar en formol al 5 %
↓
Lavar con agua
↓
Cortar por congelación
↓
Extender los cortes en agua
↓
Teñir 15 min con picrocarmín
↓
Escurrir
↓
Montar en glicerina gelatinada

Teñir en bloque con hemalumbre
↓
Alcohol-éter (1 día)
↓
Celoidina al 15 % (1 semana)
↓
Celoidina al 30 % (1 semana)
↓
Dejar evaporar para que se densifique
↓
Montar sobre el portabloques
↓
Endurecer con cloroformo (2 h)
↓
Etanol de 80° (6 h)
↓
Cortar con micrótomo de navaja oblicua, lubrificar
↓
Pegar los cortes
↓
Alcohol
↓
Esencia de girasol
↓
Montar en resina

Acetona (2 días)
↓
Tricloroetileno (2 h)
↓
Parafina + 30 % de tricloet. (1 h)
↓
Parafina a 60° (24 h)
↓
Confeccionar el bloque
↓
Cortar
↓
Planchado de los cortes con agua caliente
↓
Pegar los cortes con albúmina
↓
Dejar secar durante 12 h (a la estufa a 40°)
↓
Desparafinar con esencia de girasol o con xilol o tolueno
↓
Lavar con etanol de 80°
↓
Teñir con una laca de hematoxilina
↓
Lavar con agua
↓
Teñir con eosina
↓
Etanol de 90°
↓
Esencia de girasol
↓
Xilol o toluol
↓
Montar en una resina, natural o sintética

Los tiempos que figuran en los diversos procesados son relativos, dependen del tamaño de la muestra, así como de su consistencia, si se procesa pulmón, al ser un órgano esponjoso los líquidos penetrarán más fácilmente que si se tratara de riñón. Algunos autores prefieren someter los cortes a mayor número de alcoholes. Las técnicas deben tantearse para cada tipo de material, siguiendo evidentemente una marcha general que puede ser la señalada por el autor de este Manual. *(N. de la T.)*

acuosa saturada; C: solución acuosa verde luz al 0,2 % acetificada al 0,2 %.

Teñir con safranina A durante 24 h; lavar rápidamente con agua; diferenciar con ácido pícrico; teñir durante 30 s con verde luz; deshidratar y montar.

Núcleos, centrosomas, corpúsculos basales de cilios: rojo; *citoplasma:* verde; *estructuras muy acidófilas:* amarillo.

Tricrómico triácido de Ehrlich-Biondi-Heidenhain. — Teñir de 10 min a 3 h en el triácido al 0,2 % acuoso; acetificado por 2 gotas de ácido acético; lavar rápidamente con agua acetificada al 0,5 %; diferenciar con etanol de 70° hasta que el conjunto tenga una tonalidad rojiza; deshidratar y montar.

Cromatina nuclear: verde-azulada; *nucléolo:* rojo; *mucinas y cartílago:* verde; *colágena:* roja; *granos de secreción:* rojos.

Para el montaje deben evitarse los portaobjetos de vidrio blanco por ser demasiado básico, así como el bálsamo del Canadá.

Tricrómico de Dobell. — Azul de metilo-eosina naranja G. La mezcla azul de metilo-eosina o Mann-bi-ácido se puede adquirir ya preparada en el comercio; se utiliza en solución acuosa saturada al 0,2 %. Se tiñe de 1 a 2 días con este colorante, seguidamente se lava rápidamente con agua y se diferencia con una solución al 0,1 % de naranja G en etanol de 70°, vigilándolo al microscopio; deshidratar y montar.

Cromatina nuclear: azul oscuro; *nucléolo:* rojo; *citoplasma:* violeta, azul o rosa; *colágena:* azul; *hematíes:* rojos; *fibras musculares:* rojas o rosas.

Tricrómico de Mann-Dolominici. — Eritrosina-naranja G-azul de toluidina.

En este caso es desaconsejable la fijación con formol. *Preparar:* **A)** 0,2 g de eritrosina amarillenta + 0,6 g de naranja G + agua: 100 ml + una gota de ácido acético. — **B)** Azul de toluidina: solución acuosa al 0,5 %. — **C)** Agua acética al 0,2 %.

Teñir con **A** durante 5 min; lavar con agua destilada, teñir 2 min con **B**; lavar con agua; diferenciar con agua acética **C** hasta que los cortes adquieran una tonalidad rojiza, después con etanol de 96° hasta que aparezca una tonalidad azulada en las zonas basófilas; deshidratar y montar.

Núcleo y estructuras basófilas: azul intenso; *citoplasma:* de rosa a amarillo; *colágena:* rosa; *mucinas:* púrpura; *granos de secreción:* rosa intenso.

Dicrómico de Lillie y Pasternack, eosinato de dimetil-tionina. — **Preparar: A)** Una solución de dimentil-tionina al 0,1 % en agua. — **B)** Solución de eosina azulada al 0,1 % en agua. — **C)** Ácido cítrico M/10 agua. — **D)** Fosfato disódico M/10 agua.

Antes de usar mézclese: **A**: 4 ml + **B**: 4 ml + **C**: 1,2 ml + **D**: 0,8 ml + acetona: 5 ml + agua: 25 ml. Teñir durante 1 h; deshidratar con acetona y montar.

Las soluciones **A** + B pueden sustituirse por 0,5 ml de Giemsa.

Núcleos, bacterias, rickettsias: azul; *granos basófilos:* azul-violeta; *depósitos calcificados:* azul oscuro; *citoplasma vivo* en el momento de la fijación: azul-violeta; *citoplasma necrosado:* rosa oscuro; *hematíes:* naranja; *feocromos:* verde; *fibrina, queratina* y *amiloide:* rosa.

II. — MÉTODOS ESPECIALES UTILIZADOS EN HISTOLOGÍA ANIMAL

TINCIÓN DE LA SANGRE Y DE LOS PARÁSITOS ENDOCELULARES

Se tiñen las extensiones de sangre obtenidas según la técnica descrita en la página 139 con tinciones especialmente diseñadas para ello.

Las tinciones hematológicas. — Se ha convenido designar así las *tinciones panópticas* de Pappenheim (1910), su principio general es el que sigue:

Las extensiones secadas al aire y fijadas por el calor, al pasar los portaobjetos durante algunos segundos a la llama de un mechero, a unos 90°, son recubiertas por una gran gota de un colorante neutro disuelto en alcohol metílico, como puede ser el eosinato de azul de metileno (colorante de May-Grünwald); tras un breve espacio de tiempo se añade agua neutra a fin de que disocie el colorante en sus dos componentes, el uno ácido y el otro básico, que irán a fijarse sobre las estructuras basófilas y acidófilas; en una segunda fase se tiñe con una solución diluida de eosinato de azul de metileno (colorante de Giemsa). Estos colorantes ya se venden preparados en el comercio.

Panóptico de Pappenheim. — Aplicar sobre extensiones secas que lleven menos de una semana

preparadas, fijadas al calor, por haberlas pasado un par de veces por la llama del mechero Bunsen (por encima, no por dentro de la llama); verter sobre la extensión de diez a veinte gotas del colorante de May-Grünwald disuelto al 0,25 % en metanol puro; dejar actuar de 2 a 3 min; añadir diez gotas de agua destilada neutra (a pH: 6,8) o tamponada a este pH; dejar actuar durante 3 min; lavar rápidamente con la misma agua; recubrir con una solución muy diluida de Giemsa obtenida vertiendo una gota de la solución madre al 1 % en metanol-glicerina, a partes iguales, en 1 ml de agua neutra o tamponada; dejar reposar 20 min; lavar con la misma agua; escurrir; secar; tras haber depositado una gota de aceite de cedro sobre la extensión se procede a la observación.

Panóptico de Wright. — La solución madre tintorial está formada por el colorante de Wright al 0,5 % en metanol absoluto: recubrir los frotis con la solución madre; dejar actuar durante 2 min; añadir tres veces su volumen de agua neutra o tamponada a pH: 6,8; mezclarlo bien; dejar actuar 5 min; lavar con agua neutra; escurrir; secar.

Panóptico de Lillie. — La solución tintorial madre es del 0,5 % en metanol-glicerina a partes iguales; fijar durante algunos minutos con metanol; teñir 5 min en frascos de Borrel en la mezcla formada por solución madre: 4 ml + acetona: 3 ml + tampón a pH 6,5: 2 ml + agua destilada: 31 ml + tampón a pH 6,5: 2 ml + agua destilada: 31 ml; lavar, escurrir, secar.

A fin de poner de manifiesto la sustancia granulofilamentosa de los reticulocitos se coloca sobre la extensión, antes de efectuar la tinción panóptica, un cubreobjetos con una gruesa gota de azul de metileno en solución acuosa del 0,2 %. Se hace la observación con el colorante colocado entre porta y cubreobjetos; seguidamente puede aplicarse cualquier solución panóptica, preferentemente la de Lillie.

Todas estas técnicas se aplican indistintamente sobre las extensiones, las aposiciones de la sangre y de los órganos hematopoyéticos.

Núcleos: rojo-violáceo; *citoplasma basófilo:* azul; *citoplasma acidófilo:* rojo; *granulaciones de los linfocitos:* púrpuras; *de los mielocitos:* violeta; *neutrófilos:* parduscos o azulados; *gránulos eosinófilos:* rojo ladrillo; *basófilos:* azul ultramar.

Pancrómico de Pappenheim. — Es una mezcla que ya se encuentra preparada en el comercio; está formada por: azul de metileno: 1 g + azul de toluidina: 0,5 g + dimetiltionina: 1 g + violeta de metileno: 0,5 g + eosina amarillenta: 0,75 g. Se disuelve 3,75 g de esta mezcla en metanol: 250 ml + glicerina: 250 ml + acetona: 50 ml. Llevar las soluciones tintoriales a la estufa a 37°; teñir durante 20 min en la solución madre de May-Grünwald diluida: 1 ml en 8 ml de agua; lavar; teñir en el pancrómico de Pappenheim diluido: 1 ml en 75 ml de agua; dejar actuar 40 min a 37°; diferenciar 10 s en el ácido acético al 0,15 %; lavar con agua; escurrir; deshidratar con acetona; aclarar y montar.

Además de las tinciones similares a las obtenidas con los otros métodos panópticos, con este método se consigue teñir la *colágena* de color azul claro; las *mucinas* de azul o violeta, el *cartílago* de azul, los *granos de secreción* de rosa a rojo o de azul a violeta.

Policrómico-azul de Unna. — Teñir durante 10 min en el policromo-azul de Unna (solución que se encuentra en el comercio ya preparada); lavar; diferenciar menos de 1 min con 1 el «eter-glicérico» de Unna diluido con agua, unas 20 veces; lavar, deshidratar con acetona; aclarar; montar.

TINCIÓN DE LOS TEJIDOS ÓSEOS Y CARTILAGINOSOS

Tinción simultánea del cartílago y del hueso. — Tras la fijación y despigmentación hay que tratar las piezas *in toto* con una mezcla preparada justo antes de usar y formada por: un volumen de solución alcohólica de 96° de azul de toluidina al 0,1 % y cuatro volúmenes de la mezcla formada por: solución saturada de sulfonato sódico de alizarina en alcohol de 96°; 10 ml + etanol de 70° con un 1 % de ácido acético: 90 ml. El tratamiento dura de 2 a 15 días en la estufa a 40°; extraer el exceso de colorante mediante una serie de lavados sucesivos con agua acética al 0,5 % y etanol de 70°; deshidratar, montar o conservar en la mezcla: benceno: 100 ml + benzoato de bencilo: 200 ml. El *cartílago* es azul, los *huesos* rojos.

Tinción y cortes por desgaste del hueso fresco. A lo largo de todo el procesado el hueso no debe secarse en ningún momento. Recortar el hueso fresco en secciones delgadas con la sierra de cortar metales. Seguidamente, deben sumergirse los cortes en una solución saturada de pararrosanilina preparada con etanol de 50°, durante 2 a 3 días; después en una solución saturada del mismo colorante en alcohol de 96° durante el mismo tiempo; finalmente en una solución saturada preparada en alcohol etílico absoluto durante el mismo tiempo. Pasar los cortes por xilol, donde pueden conservarse por tiempo indefinido. Humedeciéndolo constantemente con xilol debe desgastarse la sección de hueso pasándola por una piedra pómez primero y por otra más fina, tipo Arkansas; lavar con xilol limpio y montar en una resina. Los *osteocitos* quedan de color rojo intenso.

Visualización de las lagunas óseas. — Se procederá al desgaste y pulido del hueso seco, liberado de la materia orgánica por haberlo previamente macerado con agua tibia durante varios meses, puede acelerarse este proceso trabajando con papaína o bien con un alcohol diluido; posteriormente se pasa por tricloroetileno; seccionado en cortes delgados con una cuchilla diamantada; termina de adelgazarse pasándolos por una piedra pómez o sobre una placa de vidrio que está untada con una suspensión acuosa de un abrasivo; lavar con agua, deshidratar con acetona; aclarar con benceno y dejar al aire. Las dos caras de la lámina delgada son sucesivamente tratadas por una delgada capa de esmalte de uñas incoloro; seguidamente se monta en una resina, entre porta y cubreobjetos. Las *lagunas óseas* y los *canalículos* se han llenado de aire y aparecen de color negro; con el microscopio de luz polarizada pueden estudiarse las birrefringencias del tejido óseo.

Visualización de las zonas calcificadas. — Descalcificar con ácido tricloroacético; lavar con agua que contenga un 5 % de sulfato de Na durante 3 h; lavar con agua corriente; deshidratar; aclarar, incluir; cortar; desparafinar; hidratar; teñir fuertemente con hemalumbre; lavar con agua corriente; teñir algunos minutos con una solución acuosa al 0,3 % de rojo Congo; lavar con etanol de 96°; deshidratar; aclarar y montar. *Núcleos* y *cartílago:* azules; *hueso calcificado:* rosa; *hueso no calcificado:* rojo ladrillo.

Visualización de las fibras nerviosas en los tejidos calcificados. — Fijar con la siguiente mezcla; hidrato de cloral: 2,5 g + agua destilada: 50 ml + etanol: 50 ml + ácido nítrico: 3,4 ml; durante 1 a 4 días; renovar el líquido 2 o 3 veces. Recortar las piezas excesivamente voluminosas en secciones de 2 a 4 mm; lavar con agua destilada de 2 a 36 h; tratar algunas horas con etanol amoniacal de 96° (4 gotas en 50 ml de alcohol de 96°); lavar con agua destilada. Impregnar con una solución acuosa al 2 % de nitrato de plata, durante unos 7 días a 37° hasta que adquiera una tonalidad pardo-grisácea. Lavar, reducir en ácido pirogálico: 1 g + formol: 10 ml + agua: 90 ml, durante unas 24 h; lavar; deshidratar; cortar y montar. Las *neurofibrillas* quedan de color negro sobre un fondo amarillo.

TINCIÓN DE LAS FIBRAS MUSCULARES

Generalmente se ponen de manifiesto con las técnicas de tinción de las fibras de colágena y distinguiéndose perfectamente bien de ellas. El mejor método es el de Neubert (1940).

Tinción con la laca alumínica del azul ácido de alizarina. — Preparar una laca alumínica de azul ácido de alizarina para lo cual se hierve durante 10 min: 0,5 g de azul de alizarina + sulfato alumínico: 10 g + agua: 100 ml; enfriar, completar hasta 100 ml.

Teñir durante 30 min con la laca; lavar; tratar de 5 a 30 min con el ácido fosfotúngstico acuoso al 5 %; lavar; virar de 5 a 30 min con una solución acuosa de acetato de cobre al 5 %; lavar; deshidratar y montar.

La visualización de los detalles estructurales de las fibras se hace mediante la técnica de Walter (1929) o de Pasini.

Tinción con el azul de anilina-orceína, etileosina, rosanilina ácido trisulfonado (mezcla de Pasini). — Preparar la mezcla de Pasini: **A**) disolver 1 g de azul de anilina en 100 ml de agua, separadamente disolver 1 g de orceína en 50 ml de etanol absoluto al cual se le añaden 5 ml de ácido acético y 20 ml de glicerina; mezclar las dos soluciones; **B**) etileosina al 2 % en etanol de 50°; **C**) Solución acuosa saturada de rosanilina en ácido trisulfonado; **D**) ácido fosfotúngstico en solución acuosa al 2 %.

Tratar siguiendo el método de Pasini durante 20 min por **D**; lavar; teñir durante 20 min con la mezcla: **A:** 30 ml + **B**: 30 ml + **C**: 4 ml + glicerina neutra: 25 ml; lavar; diferenciar con etanol absoluto controlando bajo el microscopio; pasar algunos segundos con el ácido fosfotúngstico; deshidratar y montar.

Si se sigue la variante de Walter deberá someterse el material durante 24 h en un mordiente: solución de alumbre férrico al 2,5 % preparado justo antes de usar; lavar; teñir durante 24 h en la mezcla de Pasini; lavar; tratar con etanol de 96° hasta que cese la emisión de nubes teñidas; deshidratar y montar.

TINCIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO

Visualización de la sustancia tigroidea de Nissl. El mejor método es el de la *laca crómica de gallocianina;* la técnica a seguir se halla descrita en la página 237.

Tinción con el azul de metileno a pH ácido. — Teñir durante 10 min en: acetato de Na, N: 1 ml + ácido acético, N: 1 ml + azul de metileno: 0,064 g + agua: 98 ml; el pH de la solución es de 4,65; lavar en el mismo tampón sin azul; tratar para insolubilizar durante 5 a 10 min en una solución acuosa al 4 % en molibdato amónico; lavar con agua; deshidratar; montar. Tiñe en azul los *grumos de Nissl,* la *cromatina* y los *nucléolos.*

Tinción específica de las células ganglionares

Tinción vital o posvital con azul de metileno. Es el método alternativo, pero debe adaptarse para cada caso particular. El colorante se pone en contacto con los tejidos bajo forma de una solución acuosa muy diluida —0,05 al 0,5 %— bien sea por perfusión, bien por inyección subcutánea, por inyección intersticial, por inyección intraperitoneal o en la cavidad celómica o simplemente por inmersión del órgano fresco en la solución; se ajusta el tiempo y las concentraciones, por tanteo, en cada caso; se expone seguidamente al aire durante 10 a 30 min, evitando la desecación, a fin de estabilizar el colorante. Seguidamente se hace virar con la solución: sulfocianuro de amonio: 1,12 % + agua calentada a 60° para disolver, después enfriar y saturar de picrato de amonio al baño maría a 35° (atención: el picrato en seco es explosivo). Montar en glicerina gelatinada saturada de picrato amónico. Las *fibras nerviosas* quedan de color violeta-pardusco.

■ **Impregnación con sales metálicas: de plata o de mercurio.** — Los nombres de Golgi y de Ramón y Cajal están asociados a estos métodos, sin embargo los resultados de estas técnicas son aleatorios, dado que se requiere una gran pericia.

Recomendamos los siguientes:

■ **Impregnación con cromato de plata según Kopsch-Bubenaite.** — Fijar con formol salino; poscromizar con una solución acuosa al 2,5 % de dicromato K a 34° durante 2 días, enjuagar; lavar con una solución acuosa de nitrato de plata al 2 %; impregnar a 34° en esta misma solución durante 2 días; lavar, cortar preferentemente por congelación; lavar; deshidratar y montar.

■ **Impregnación con mercurio según Cox.** — Fijar e impregnar simultáneamente durante 1 a 2 meses en la mezcla: solución acuosa al 5 % de cloruro mercúrico: 100 ml + solución acuosa al 5 % de dicromato K + agua destilada: 200 ml + solución acuosa al 5 % de cromato K: 80 ml (diluir el cromato en el agua y añadir la mezcla de los otros dos); cambiar el fijador al cabo de dos días); lavar con etanol de 70°; hidratar; cortar por congelación; lavar con agua destilada; tratar durante 1 h con una solución acuosa de carbonato K al 5 %; lavar con agua; deshidratar; montar. Las células quedan de color negro intenso sobre fondo muy claro.

Tinción de neurofibrillas y del neuroplasma

■ **Impregnación con osmio-yoduro de zinc.** — Preparar justo antes de usar el yoduro de zinc añadiendo a 200 ml de agua, 20 g de zinc en polvo y 5 g de yodo; fijar e impregnar en una mezcla formada por: solución acuosa al 2 % de tetróxido de osmio: 2 ml + solución de yoduro de Zn: 8 ml; duración de la impregnación durante 1 a 2 días; deshidratar; incluir; cortar; desparafinar y montar.

■ **Impregnación-reducción con nitrato de plata.** — Preparar: **A)** Solución de sosa N. — **B)** Solución acuosa de nitrato de plata al 10 %. — **C)** Hidroquinona: 2,5 g + agua: 100 ml + formol: 5 ml.

Fijar con formol; cortar por congelación; tratar con la solución **A** de sosa, más o menos diluida según el material; lavar 1 h; tratar durante 12 a 24 h con la solución **B**, nitrato de plata; igualmente diluido según los materiales; colocar los cortes en un vidrio de reloj que contenga la solución reductora de hidroquinona **C**, se sigue el proceso al microscopio; interrumpir el proceso con un lavado de agua destilada a partir de que los axones aparezcan de color negro; deshidratar con etanol de 96°, después con benceno fenicado; montar.

■ **Impregnación con oro-plata de Gros-Schultze.** — Preparar: **A)** Nitrato de plata acuoso a 20 %. — **B)** Formol al 20 %. — **C)** Amoníaco al 20 %. — **D)** Cloruro de oro acuoso al 0,2 %. — **E)** Hiposulfito de Na al 5 % en solución acuosa. — **F)** Complejo amoniacal de plata preparado justo antes de usar, añadiendo gota a gota el amoníaco a una solución acuosa de nitrato de Ag al 20 % hasta lograr que se redisuelva el precipitado.

Fijar con formol neutro durante 10 días; lavar con agua durante 1 h; cortar por congelación; recoger los cortes en agua; tratar durante 1 h en la solución **A**, en la oscuridad; pasar los cortes a la solución **B**, agitando, cambiar 6 veces de baño; hasta que no haya emisión de nubes blanquecinas; impregnar con **F** añadiéndole una gota de amoníaco; vigilar en un vidrio de reloj y bajo el microscopio; lavar con amoníaco diluido; lavar con agua destilada a la que se le ha añadido una gota de ácido acético por 10 ml; virar a color gris en la solución **D**; lavar, pasar rápidamente en la solución **E**; lavar con agua corriente; montar en un medio hidrófilo.

■ **Impregnación áurica de Carey.** — No utilizar ningún instrumento metálico; sumergir el objeto en jugo de limón fresco filtrado, durante 5 min; sumergir en una solución acuosa de cloruro de oro durante 10 a 60 minutos a la oscuridad. Tratar en la oscuridad durante 12 horas con ácido fórmico al 25 %; lavar con agua; conservar en etanol de 50° + glicerina, a partes iguales; disociar en este medio; montar con glicerina gelatinada.

Tinción de la mielina

■ **Impregnación ósmica.** — Situar durante 24 h el material en una solución acuosa al 0,5 % de tetróxido de osmio: lavar 30 min en agua destilada; impregnar 1 h en glicerina acuosa al 50 %; después, 2 h en glicerina pura; disociar en este último medio; montar en glicerina gelatinada.

■ **Método mielínico de Nageotte.** — Cortar por congelación; eliminar las grasas por tratamiento con etanol absoluto; teñir con hemalumbre durante 30 min; lavar 1 min con agua corriente; diferenciar en la solución: bórax: 2 g + ferricianuro de K: 2,5 g + agua: 100 ml, controlando bajo el microscopio; lavar con agua ligeramente amoniacal; deshidratar; montar.

■ **Tinción con negro Sudán.** — Pasar el material 20 s en etanol de 50°; teñir varias horas en una solución alcohólica saturada de negro Sudán; lavar con alcohol etílico de 95°; montar en un medio hidrófilo.

Tinciones neuróglicas

■ **Método del cristal violeta de Holzer.** — Pasar el material por etanol de 50°, seguidamente de 2 a 3 min en una solución fosfomolíbdica: 1 vol. + etanol de 96°: 3 vols. (actúa de mordiente). Secar con cuidado y pasarlo por una mezcla de: cloroformo: 8 ml + etanol absoluto: 2 ml; posteriormente por la solución tintorial: etanol absoluto: 2 ml + cloroformo: 8 ml + cristal violeta: 1 g, durante 5 s; eliminar el exceso de colorante con una solución acuosa al 10 % de bromuro K, hasta obtener una tonalidad azul-negruzca uniforme; enjuagar; diferenciar con la mezcla preparada extemporáneamente formada por: anilina 4 ml + cloroformo: 6 ml + ácido acético al 1 %: 1 gota; lavar con benceno; montar.

■ **Impregnación con carbonato de plata de Río Hortega.** — Los cortes obtenidos por congelación se tratan durante 10 min en una solución acuosa al 5 % de sulfito de Na; impregnar pasando por tres baños de carbonato de plata preparado extemporáneamente: añadir a 5 ml de solución acuosa al 10 % de nitrato de plata: 20 ml de solución acuosa al 5 % de carbonato de Na anhidro. Redisolver el precipitado añadiendo amoníaco, gota a gota. Los cortes permanecerán 30 s en el primer baño, 1 min en el segundo, 2 min en el tercero. Reducir durante 1 min con formol al 1 %; lavar con agua; virar con cloruro de oro en solución acuosa al 0,2 %; lavar con agua; deshidratar y montar.

Tinción de células neurosecretoras. — No existe ninguna técnica altamente específica de los granos de secreción. Las secreciones ácidas pueden ponerse de manifiesto por oxidación permangánica seguida de una tinción con hematoxilina o con la fucsina-paraldehído.

Oxidar hasta que adquiera una tonalidad color tabaco con una solución ácida de permanganato: permanganato K al 2,5 %: 1 vol. + ácido sulfúrico al 5 %: 1 vol. + agua destilada: 8 vols.; lavar; diferenciar con una solución acuosa al 4 % de metabisulfito de sodio; lavar; teñir con hematoxilina (cf. p. 192) o con la fucsina paraldehído (cf. p. 228).

TINCIONES BACTERIOLÓGICAS

Las bacterias pueden teñirse en extensiones o bien *in situ*, en los tejidos. Hemos intentado unificar los métodos y los que hemos elegido pueden aplicarse tanto sobre frotis como sobre cortes tisulares.

Tinción de Gram. — Preparar: **A)** Cristal violeta: 5 g + etanol de 95°: 10 ml + anilina: 2 ml + agua: 88 ml. **B)** Lugol fuerte: Yodo: 1 g + IK: 2 g + agua destilada: 200 ml. **C)** Anilina: 10 ml + xilol: 10 ml.

Teñir eventualmente los núcleos con una laca de rojo nuclear antes de aplicar el Gram; teñir eventualmente el fondo con la eosina o la safranina al 1 % durante 5 min. Teñir en la solución **A** durante 10 min; lavar. Aplicar durante 5 min el Lugol, solución **B** (actúa de mordiente); lavar; escurrir; diferenciar con **C**; frenar la diferenciación con xilol puro; montar.

Los gérmenes Gram positivos (Gram +) aparecen de color violeta oscuro sobre fondo rosa. Atendiendo a que la diferenciación sea más o menos fuerte, los *mucus*, la *fibrina*, la *sustancia hialina,* los *núcleos* y los *parásitos* endo y ectocelulares, son más o menos Gram +.

Tinción con la fucsina fenicada de Ziehl. — Preparar: una solución alcohólica al 3 % de pararrosanilina y una solución acuosa de fenol al 5 %; mezclar 1 vol. de la primera con 9 vols. de la segunda; la solución se conserva bien. Teñir durante 3 a 5 min, a 95°, o 3 h a 60°, o 24 h a temperatura normal; lavar con agua; diferenciar con etanol de 70° acificado por ClH 3 %. La preparación debe aparecer completamente desteñida a simple vista; lavar; tinción de contraste con azul de metileno diluido al 0,1 % durante 2 min; lavar; deshidratar y montar.

Los gérmenes «acidorresistentes» quedan de color rojo vivo sobre un fondo azul-pálido. Los frotis pueden someterse a una tinción negativa en negro al someterlos a una solución acuosa al 5 % de nigrosín.

Tinción de las micobacterias ácido-alcohol-resistentes. — Preparar según el método de Armand: anilina: 16 ml + etanol: 530 ml + azul de metileno: 16 g + NO_3H: 153 ml + agua. Recubrir la preparación con el colorante durante 1 min; lavar con agua; dejar secar. La preparación debe quedar de color azul transparente. Las *micobacteriáceas* aparecen de color rojo sobre fondo azul.

Tinción de cuerpos grasos bacterianos. — Solución de negro Sudán azulado al 0,3 % en etanol de 70°; teñir en esta solución sin agitar, durante 10 a 20 min; enjuagar; tinción de fondo con safranina al 0,5 % acuosa durante 5 a 10 s, lavar; observar con aceite de inmersión.

Tinción de Loeffler con azul de metileno. — Preparar: azul de metileno: 0,3 g + etanol de 95°: 30 ml + KOH al 0,01 %: 100 ml; teñir algunos segundos con esta mezcla, lavar; observar montado en una gota de agua o bien secar y montar.

Tinción con azul de toluidina + verde de metilo de Albert. — Preparar: azul de toluidina: 0,15 g + verde de metilo: 0,02 g + ácido acético: 1 ml + etanol de 96°: 2 ml + agua: 100 ml; teñir durante 5 min; enjuagar; pasar por la solución de Lugol fuerte, como en el caso del Gram; lavar; enjuagar; secar; observar con aceite de inmersión. *Gránulos:* verde oscuro; *otras bacterias:* verde claro.

Fluorocromo acidorresistente. — Preparar una solución de auramina: 0,1 g + fenol: 3 ml + agua: 97 ml. Teñir durante 2 a 3 min; lavar; diferenciar en una solución fresca de etanol de 70°: 100 ml acidificada con 0,5 g de ClNa, lavar; secar; examinar con fluorescencia excitada por luz UV o con luz azul. Los gérmenes *acidorresistentes* presentan fluorescencia amarilla intensa.

Tinción de las esporas bacterianas con verde malaquita. — Depositar sobre la extensión microbiana una gran gota de una solución acuosa al 5 % de verde malaquita durante 30 s, después hervir la gota 3 o 4 veces; lavar seguidamente con agua; teñir durante 30 s con una solución acuosa de safranina al 0,5 % o con mercurocromo al 5 %; lavar y secar. Las *esporas* quedan de color verde sobre un *fondo celular* rojo.

Tinción de flagelos bacterianos con la pararrosanilina de Leifson. — Desengrasar cuidadosamente los portaobjetos dejándolos durante una semana en una mezcla sulfocrómica: lavar con agua destilada; secar; pasar a la llama del Bunsen para que se vuelvan adherentes; delimitar con un lápiz graso una zona en forma de U en el sentido longitudinal del portaobjetos; colocar una gruesa gota de suspensión bacteriana, eventualmente enriquecida por previa centrifugación, en el fondo de la U, dejarla escurrir hacia la parte abierta de la U, inclinando el portaobjetos dejar secar al aire; añadir seguidamente la mezcla, a partes iguales, de las tres soluciones siguientes: **A)** ClNa al 1,5 % acuoso. **B)** Ácido tánico acuoso al 3 %. **C)** Pararrosanilina al 1,5 % en etanol de 95°; dejar actuar 5 min; lavar sin sacar la gota de colorante; dejar decantar; secar; los *flagelos* quedan de color rojo.

Tinción de bacterias del suelo con rosa de Bengala: técnica de Conn. — Poner la muestra de suelo en suspensión en 5 a 10 veces su volumen en una solución acuosa tibia de gelatina al 0,015 %; mantener caliente dejándolo sobre agua hirviendo; teñir un minuto con la solución: rosa de Bengala: 1 % en fenol acuoso al 5 % que contiene un 0,01 % de Cl_2Ca; dejar enfriar; observar; las *bacterias* quedan teñidas de color rojo.

Tinción de los gránulos metacromáticos. — Preparar: **A)** Azul de metileno: 1 g + etanol de 95°: 20 ml + ácido acético: 20 ml + agua destilada: 900 ml. **B)** Pardo Bismarck: 0,5 g + agua destilada: 250 ml, disolver en caliente. Teñir con la solución **A** 5 min en caliente, cambiando 2 veces el colorante. Lavar. Teñir con **B** durante 10 s, observar montado en una gota de agua: *bacterias:* pardo-amarillentas; *corpúsculos metacromáticos:* azul oscuro.

Impregnación argéntica de las espiroquetales. Preparar: **A)** Formol al 40 %: 2 ml + ácido acético: 1 ml + agua destilada: 100 ml. **B)** Fenol 1 g + tanino: 5 g + agua destilada: 100 ml. **C)** nitrato de plata: 5 g + agua destilada: 100 ml + amoníaco gota a gota hasta la redisolución del precipitado.

Verter una gota de **A**, repetir la operación hasta la obtención de un frotis blanco y decantar el líquido incoloro; lavar con etanol de 90°; secar; dejar actuar **B** en caliente durante 1 min sin hervir; dejar reposar durante 30 s; lavar con agua corriente y posteriormente con agua destilada; pasar por **C** durante 1 min a temperatura ambiente; renovar el agua y calentarla sin que llegue a hervir; la extensión debe tener una tonalidad general pardusca; en caso de no tenerla debe repetirse el tercer paso; lavar, secar y observar con aceite de inmersión. Las *Spirochaetas* quedan de color violeta-negruzco sobre fondo pardo.

Siderorresistencia. — Fijar con formol durante 1 día; después con dicromato K al 1 % durante una semana; después con tetraóxido de osmio al 1 % de 2 a 4 días; lavar durante 12 h; deshidratar; incluir en parafina si se trata de tejidos; impregnar durante 15 min a 50° con una solución acuosa de alumbre férrico al 3,5 %; teñir con una solu-

ción de hematoxilina al 0,5 % durante 15 min; diferenciar con alumbre férrico hasta que los núcleos queden desteñidos; únicamente las *bacterias* y las *mitocondrias* quedan teñidas de color pardo-negruzco.

Tinción de la cápsula. — Ver las técnicas micológicas, página 311.

TINCIÓN DE LOS TEJIDOS QUE CONTIENEN COLÁGENA

Se utilizan dos tipos de métodos: aquellos que se basan en las distintas velocidades de difusión de dos colorantes ácidos en competición y los que se basan en la limitación de la penetración de un colorante en el seno de las fibras por los ácidos fosfomolíbdicos o fosfotúngsticos.

Tricrómico competitivo con picro-indigocarmín-hemalumbre o PIC-Hemalumbre. — Disolver 0,4 g de carmín de índigo en 100 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico. Teñir los núcleos con hemalumbre de Masson o de Hansen; lavar 3 min con agua corriente; teñir 10 s con el picroindigocarmín; deshidratar y montar.

Núcleos: marrones; *colágena:* azul; *citoplasma:* amarillo-verde.

Tricrómico competitivo de Ramón y Cajal, o PIC-pararrosanilina. — Preparar como en el caso anterior picro-indigocarmín, después la pararrosanilina fenicada de Ziehl, triturando: pararrosanilina: 1 g + fenol: 5 g + etanol de 96°: 10 ml + 90 ml de agua destilada (verterla lentamente).

Teñir durante 10 min con pararrosanilina de Ziehl diluida 9 veces su volumen en agua (no se guarda); lavar con agua corriente; tratar con agua acética al 0,5 %; teñir 10 min con el picrocarmín de índigo; volver a tratar con agua acética durante 30 s; diferenciar con etanol absoluto bajo el microscopio; frenar la diferenciación con benceno; montar.

Núcleos: rojos; *citoplasma:* amarillo a verde; *granos de secreción:* rojo, amarillo o azul; *mucopolisacaridos:* violeta; *colágena:* azul.

Tricrómico competitivo PIC-rojo nuclear sólido. — Preparar picro-indigocarmín como en el caso anterior y, separadamente, una laca alumínica de rojo nuclear sólido, disolviendo en caliente: rojo nuclear sólido: 0,1 g + sulfato alumínico: 5 g + agua: 100 ml; dejar reposar 24 h, filtrar, añadir: formol: 1 ml.

Teñir de 2 a 4 min con la laca; lavar con agua; teñir 5 min con picro-indigocarmín; lavar con agua acética al 0,5 %; deshidratar y montar.

Núcleos: rojo; *citoplasma:* rosa, gris o amarillo; *colágena:* azul.

Tricrómico competitivo PIT-Hematoxilina. — Mezclar: solución acuosa de ácido pícrico: 100 ml + solución acuosa al 1 % de rojo de Tiziano: 7,5 ml.

Teñir los núcleos con una laca férrica progresiva de hematoxilina de Weigert o de Groat; pasar algunos minutos en la solución picro-Tiziano; lavar; deshidratar y montar.

Núcleos: negro; *colágena:* rojo; *citoplasma:* amarillo; *mucopolisacáridos ácidos:* rosa.

Es el único tricrómico competitivo que admite un lavado en agua después de la tinción y que no se decolora tras un montaje por la alcalinidad del vidrio de los portaobjetos.

Tricrómico competitivo PIN-rojo nuclear sólido. — Preparar como en el caso anterior una laca alumínica de rojo nuclear sólido, después un picro-negro carbonoso amarillento (PIN) de Heidenhain: disolver 1 g de negro carbonoso amarillento en 400 ml de solución acuosa saturada de ácido pícrico, añadir 80 ml de metanol y 320 ml de agua destilada.

Teñir los núcleos con la laca nuclear; lavar con agua corriente; teñir 2 min con PIN; lavar con agua acética al 0,5 %; deshidratar con etanol absoluto; montar.

Núcleos: rojo; *colágena;* negro; *citoplasma:* amarillo, rosa o gris verdoso.

De todos los tricrómicos competitivos es el mejor para la colágena.

Policrómico competitivo PBPP de Gaussen. — Preparar las 4 soluciones colorantes siguientes: **A**) Ponceau rubescente: 1 g + agua destilada: 100 ml + ácido acético: 1 ml. **B)** Azul de anilina: 3 g + agua destilada: 100 ml, disolver por ebullición, enfriar + ácido acético: 2,5 ml, filtrar. **C)** Solución acuosa saturada de ácido pícrico. **D)** Pararrosanilina: 0,5 g + etanol de 96°: 100 ml.

Mezclar extemporáneamente: **A:** 1,2 ml + **B:** 0,5 ml + **C:** 6 ml + **D:** 6 ml + agua: 11 ml, progresivamente y agitar con precaución. Teñir durante 2 min con esta mezcla; deshidratar 10 s con etanol absoluto; montar.

Núcleos: rojo; *citoplasma:* gris-rosáceo; *colágena:* azul; *hematíes:* amarillo; *fibroglia:* rojo; *mucopolisacáridos:* azul-violáceo.

Los métodos que ponen en juego el bloqueo de la tinción con los ácidos fosfomolíbdico o fosfotúngstico son estudiados en la página 277.

TINCIÓN DEL GLUCÓGENO Y DEL GALACTÓGENO

Tinción con el APS (ácido periódico-Schiff). — El glucógeno es APS-positivo (cf. modo operatorio p. 236).

Tinción con bismutato de sodio. — Oxidar los polisacáridos con una solución al 1 % de bismutato de Na en el ácido ortofosfórico al 20 % durante 20 min. Tinción marrón del glucógeno.

Tinción con los vapores de yodo según E. J. Gilbert. — Situar algunos cristales de yodo en el fondo de un tubo ancho de pyrex; calentar, se forman vapores violetas densos, y sumergir el objeto durante algunos segundos, inclinando el tubo para hacer salir los vapores. También puede saturarse de yodo el aceite de vaselina, y con él recubrir el corte; observar en este medio; el glucógeno aparece pardo-caoba. Obviamente los almidones y sustancias amiloides se tiñen de azul con este método (cf. «Las técnicas vegetales», página 270).

Tinción del galactógeno con el rojo de rutenio. El oxicloruro de rutenio amoniacal en solución acuosa al 0,1 % acética tiñe ligeramente de color rojo el galactógeno y los compuestos pécticos. La solución no se conserva.

TINCIONES DE ESTUDIO PARA LOS TEGUMENTOS

Sustancias mucoides

Son polisacáridos asociados o no a proteínas.

Tinción de las mucosustancias neutras y ácidas con el APS-azul alcián. — Oxidar 10 min en una solución acuosa al 1 % de ácido periódico; tratar de 1 a 2 h en una solución al 1 % de clorhidrato de N,N-dimetil parafenileno diamina en un tampón cítrico a pH: 6,1; lavar; deshidratar y montar. Tiñe de marrón los *neutros* y de rojo los *ácidos*.

Mucicarmín de Mayer. — Esta tinción pone en evidencia algunos *mucus* bajo forma de inclusiones de color rosa oscuro. Lavar los portaobjetos con agua corriente: 10 min. Teñir los núcleos con el hemalumbre: 10 min. Lavar con agua corriente. Teñir los citoplasmas con una solución acuosa de amarillo de metanilo al 5 %, durante algunos minutos; lavar con agua destilada; teñir con mucicarmín al 10 %: 30 min durante 2 h; lavar con agua destilada; deshidratar y montar.

Tinción de la quitina. — Puede utilizarse el método anteriormente expuesto; las quitinas que no son APS positivas son las quitinas esclerificadas; éstas se tiñen por la siguiente reacción:

Preparar: **A)** Yodo: 6,1 g + IK: 10 g + agua destilada: 14 ml y **B)** cloruro de zinc: 60 g + agua destilada: 14 ml.

Aclarar y remojar las estructuras con diafanol; recubrir el material con una mezcla formada a partes iguales de **A** + **B**; lavar con agua; pasar por ácido sulfúrico diluido. Antes de pasar por el ácido sulfúrico, la *quitina*, la *celulosa* y la *tunicina* quedan teñidas de color violeta; tras su paso por sulfúrico, la *celulosa* y la *tunicina* quedan azules y la quitina se vuelve pardusca.

Sustancias queratinizadas

Son sustancias acidófilas, birrefringentes.

Tinción de la queratina y de la queratohialina con el hemalumbre-rojo Congo. — Teñir los núcleos con la hemalumbre (cf. p. 242); lavar; teñir de 5 a 10 min con una solución acuosa saturada de rojo Congo; lavar con agua; eliminar el exceso de colorante con etanol de 70°; deshidratar, montar.

Núcleos y *queratohialina:* azules; *queratina:* rojo.

Tinción de la tricohialina con el rojo cromo de antraceno. — Teñir 30 s a 1 min con una solución acuosa al 1 % del colorante; lavar; teñir los núcleos con hemalumbre (cf. p. 242); lavar; tratar con etanol absoluto amoniacal con 3 gotas por 100 ml; deshidratar; montar. *Núcleos:* azules; *tricohialina:* rojo.

Sustancias celulósicas

Véase la quitina para hallar un método de diferenciación entre los dos (cf. p. 264).

LOS PIGMENTOS

Se pueden visualizar, localizándoles a escala tisular y celular, desde el punto de vista de su constitución química, desde el punto de vista de su metabolización, sus enlaces con otros constituyentes celulares pueden ponerse de manifiesto con otros métodos. Según los casos, el microscopio aporta más o menos información, pero en todos los casos es indispensable.

Localización de los pigmentos

Según Locquin (1953) los principales grupos de pigmentos pueden clasificarse según su localización en:

Necropigmento: pigmento elaborado en el seno de una célula muerta por modificación de su membrana de su contenido o de un pigmento preexistente.

Epipigmento: pigmento formado por oxidación debido a rotura o agrietamiento.

Metapigmento: pigmento modificado por la edad. Se opone al siguiente.

Ortopigmento: pigmento inmutable a la rotura y a la edad.

Ectopigmento: pigmento extracelular y no perimembranoso.

Crustopigmento: pigmento incrustante o perimembranoso.

Mesopigmento: pigmento impregnante de una membrana pero no incrustante.

Endopigmento: pigmento intracelular que a su vez puede ser:

Plasmapigmento: localizado en el citoplasma.

Cistopigmento: vacuolar.

Lipopigmento: forma parte de inclusiones lipídicas.

Condriopigmento: únicamente en el condrioma.

Nucleopigmento: sólo del núcleo.

Lacteopigmento: impregnando el látex de un conducto laticífero.

Oleopigmento: forma parte de la cera de hifas oleíferas.

Las *coloraciones* de las estructuras pueden denominarse de distinta manera según los casos:

Histerocroico, desteñido localmente por la edad.

Metacroico, cambia de color por aparición de un nuevo pigmento en los tejidos viejos.

Necrocroico, cambio de color debido a la muerte tisular.

Acrocroico, teñido diferentemente en los extremos.

Epicroico, se tiñe de diferente manera al tacto, al enfriarse o al cortarse.

Entocroico, se tiñe interiormente de forma diferente.

Constitución química

Relación de las grandes categorías de pigmentos que encontraremos en histología animal y vegetal:

1.º Carotinoides. — Se trata de hidrocarburos no saturados, no nitrogenados, insolubles en agua, bastante solubles en alcohol, muy solubles en el éter de petróleo, el tolueno y sobre todo con el sulfuro de carbono. Poseen un color amarillo o rojizo y dan espectros de absorción característicos con bandas situadas entre 450 y 530 mμ aproximadamente. Los cristales de caroteno son dicroicos con reflejos morados, pleocroicos.

Caracteres químicos. — Oxidables, decolorándose, por ejemplo por el ácido crómico o por el bicromato de K al 1 %. Tinción azul intensa, posterior destrucción con ácido sulfúrico concentrado. Tinción violeta oscuro con reflejos metálicos con el Lugol.

Los carotinoides están casi siempre disuelto en los lípidos, formando lo que antiguamente se denominaban lipocromos.

Carotiprótidos (Verne) *(Carotenoalbúminas).* — Se trata de pigmentos complejos formados por un carotinoide combinado con una proteína. Su color es muy variable, oscilando del negro al rojo, pasando por el azul, el verde y el violeta. Son solubles en agua. Son fácilmente disociables por agentes físicos y químicos. Es lo que ocurre cuando se somete a cocción los crustáceos, el carotiprótido azul se separa por ebullición en carotinoide rojo y prótido.

2.º Cromolipoides o lipofucsinas. — Pigmentos amarillos, pardos o negros, sin espectro caracterizado, formado por lípidos o sus derivados, poseen una coloración propia y resultan de la oxidación de cuerpos grasos. Insolubles en agua; débilmente solubles en los disolventes de lípidos, por lo que se facilita la obtención de cortes en parafina.

Caracteres químicos. — Reacción negativa al yodo. Color pardo rojizo, nunca queda azulado tras el tratamiento con ácido cl. sulfúrico concentrado. Desteñidos, pero no destruidos con el agua oxigenada. Se tiñen con el Sudán III, con el escarlata y el negro Sudán, incluso sobre cortes en parafina. No son argentafines ni argentófilos, por lo que se diferencian de las melaninas; también pueden identificarse aplicando la *reacción de Hueck:* teñir con azul de Nilo y después tratar durante 24 h con agua oxigenada al 3 %; las melaninas quedan desteñidas, los cromolipoides conservan el color azul.

En la cirrosis atrófica del hígado se encuentra un pigmento, la *hemofucsina*, en granos pálidos, soluble en los álcalis pero no en los ácidos diluidos, colorable con los colorantes básicos de anilina, no dan reacción positiva al hierro (cf. también página 234).

Características de la tinción. — Los *pigmentos grasos (lipofucsinas)* (atrofia pigmentaria del corazón, del hígado, de las cápsulas suprarrenales, vesículas seminales, etc., pigmento de las células ganglionares) se tiñen con el Sudán y el escarlata. En fresco se tiñen con el rojo neutro al 1 %.

3.º Melaninas. — Pigmentos amarillos, pardos o negros muy resistentes a los agentes químicos y extraordinariamente distribuidos. Insolubles en todos los disolventes conocidos, salvo en las lejías alcalinas concentradas. Se decoloran con los oxidantes.

La característica de las melaninas y de los precursores de los pigmentos melánicos es la *reacción argentafín*, son a la vez argentófilos, es decir que se impregnan fácilmente con todos los medios de impregnación argéntica.

Es por lo que W. B. Dublin (1943) aplica el *método de Bodian* a base de protargol para localizar la melanina. Las piezas, fijadas con formol al 10 % e incluidas en parafina, se cortan a 8 μ. Impregnar de ocho a doce horas en protargol al 1 % a 37° (espolvorear con protargol la superficie del agua y dejar disolver sin agitar). Lavar con agua y reducir durante 10 min con hidroquinona al 1 %. Lavar y virar durante cinco minutos con el cloru-

ro de oro al 0,5 %. Lavar y pasar 5 min por ácido oxálico al 5 %, después lavar y fijar durante 5 min con hiposulfito de sodio al 10 %. Lavar intensamente con agua corriente, deshidratar y montar.

Para *diferenciar las melaninas del carbón*, emplear el ácido sulfúrico concentrado que destruye todo tipo de material orgánico y deja intacto el carbón y el sílice.

Método de Lasnier. — Este método consiste en teñir específicamente los pigmentos pardos y melánicos con el líquido de Ziehl diluido. El colorante se prepara justo antes de utilizar diluyendo la solución de Ziehl con 20 a 25 partes de agua que se va añadiendo lentamente a la vez que se va agitando.

Teñir durante medio minuto a un minuto y medio (según se trate de cortes obtenidos por congelación, incluidos en colodión o en parafina). Lavar rápidamente, después teñir intensamente con hemalumbre. Hacer *virar* a azul con un lavado en agua corriente y después *diferenciar*. Este es el punto más delicado de este método dado que esta diferenciación es muy rápida: pasar el corte por alcohol de 95° y cuando al cabo de cuatro a seis segundos aparece una tonalidad violácea de la hemalumbre hay que pasar los cortes al xilol y después montar en bálsamo del Canadá. Si la técnica ha salido bien los pigmentos melánicos quedan específicamente teñidos de color rojo intenso.

4.º Pigmentos tetrapirrólicos. — Los compuestos heterocíclicos con núcleos pentagonales se hallan ampliamente difundidos en la naturaleza y tienen un importante papel biológico. Efectivamente, los heterocíclicos nitrogenados derivan del pirrol, constituyente de los principales prótidos y de múltiples pigmentos animales o vegetales.

Entre los pigmentos de este grupo, los más sencillos son las *porfirinas*, con un solo núcleo tetrapirrólico; los otros poseen además un grupo metálico.

a) **Porfirinas.** — En la naturaleza se conocen tres tipos de porfirinas: la *coproporfirina,* soluble en el éter y en el agua, espectro de cuatro bandas (máximo de 620 a 611 mμ); la *uroporfirina,* poco soluble en éter y en agua, espectro con cinco bandas (máximo de 622 a 619 mμ); las porfirinas *solubles en el cloroformo*, espectro con cuatro bandas (máximo entre 634 y 627 mμ).

Estos compuestos no presentan reacción química utilizable en histoquímica. El único carácter que permite reconocerles es su fluorescencia roja o anaranjada, muy visible bajo la luz de Wood. Derrien y Turchini han demostrado que la mayoría de las fluorescencias rojas observadas en los organismos vivos son debidas a las porfirinas. Esta fluorescencia únicamente se manifiesta en solución. En estado sólido no son fluorescentes. En los tejidos, la fluorescencia puede manifestarse o no.

Fluorescencia primaria. — Cuando se observa un corte o un fragmento de órgano iluminado por reflexión con la luz de Wood, si hay una porfirina se aprecia una fluorescencia roja o anaranjada superponerse a la fluorescencia primaria blanquecina del tejido. En el espectroscopio, sobre el fondo continuo de fluorescencia primaria, se ve aparecer, en el rojo, bandas cuyos máximos se han indicado más arriba.

Fluorescencia secundaria. — No es necesario recurrir al empleo de los fluorocromos para evocar la fluorescencia secundaria de las porfirinas, es suficiente utilizar un disolvente apropiado. La coloración aparece inicialmente como un halo alrededor de la porfirina, posteriormente difunde rápidamente, a medida que actúa el disolvente. El período de observación es pues muy corto.

Los disolventes son: o bien ácidos (clorhídrico, acético), o bien básicos (sosa, potasa, amoníaco, piridina, sulfuro de amonio). Borst y Königsdörber han recomendado la mezcla de glicerina (2 o 3 volúmenes) y de amoníaco (1 volumen) de acción más suave o bien la mezcla de glicerina y de sulfuro de amonio en las mismas proporciones, con adición de potasa decimonormal. Esta última mezcla permite además diferenciar los pigmentos ferruginosos de los no ferruginosos, los primeros dan sulfuro de hierro negro a la luz normal. Cuando se trata de cortes obtenidos por inclusión en parafina, hay que desparafinar con xilol o toluol, y pasar directamente a la glicerina, y después hacer actuar el reactivo entre porta y cubreobjetos, bajo el microscopio, inicialmente bajo luz normal. Las fluorescencias secundarias dan espectros con bandas cuya posición depende del disolvente y permite caracterizar las porfirinas.

b) **Hemoglobina y derivados.** — La hemoglobina es el pigmento más perfecto de los tetrapirrólicos. Debido a su solubilidad es difícil de detectar. Para ello se utilizan sus propiedades peroxidásicas.

Método de Lison con leucoderivados. — Lison detecta histoquímicamente la hemoglobina mediante leucoderivados de rosanilinas sulfonados con zinc, tras una fijación durante veinticuatro a cuarenta y ocho horas con: agua: 100 ml, formol: 10 ml, acetato de plomo: 3 g. Cortar por congelación. Teñir con una solución recién preparada de zincleuco, añadiéndole antes de usar un 10 % de agua oxigenada de 10 volúmenes. Montar con jarabe de Apathy o con bálsamo. Este método es más seguro que el anterior. La hemoglobina difiere a las auténticas peroxidasas por su termoestabilidad (resiste durante 20 min a 100°).

Método de Lison con bencidina. — *Fijar* durante veinticuatro horas con formol-plomo como en el caso anterior, con la finalidad de transformar la hemoglobina en hemateína. Fijar únicamente piezas muy delgadas. *Cortar* preferentemente por congelación. *Eliminar los precipitados de plomo* sometiendo los cortes a la acción de ácido nítrico diluido (durante algunos minutos). Tratar los cortes durante 5 min a 60° con bencidina (disolver 1 dg de bencidina en 10 ml de agua destilada hirviendo, completar hasta 30 ml con agua oxigenada y volver a calentar a 60°, puede aparecer un ligero enturbiamiento que no tiene importancia). Lavar con agua a 60° y después con agua fría. *Tinción* de contraste con verde de metilo al 0,2 %. Los cortes obtenidos por congelación serán montados en jarabe gomoso de Apathy. Los cortes de parafina se escurrirán y se aclararán en isosafrol (unos 30 min). Lavar con tolueno y montar con aceite de cedro. La hemoglobina es de color marrón oscuro; los núcleos quedan de color verde.

Reacción peroxidásica de cianol. — R. C. Dunn emplea una simplificación del método de Fautrez y de

Lambert (1937) para poner de manifiesto la hemoglobina.

Solución de reserva: cianol: 1 g + agua destilada: 100 ml. Después de disolverlo, añadir polvo de zinc: 10 g + ácido acético cristalizado: 2 ml. Hervir hasta que se destiña. Se conserva durante varias semanas. Filtrar antes de emplearlo.

Reactivo a preparar extemporáneamente: Solución de reserva filtrada: 10 ml + ácido acético cristalizado: 2 ml + agua oxigenada al 3 %: 1 ml.

Los cortes que salen del agua serán tratados durante 3 a 5 min por este reactivo recién preparado. Lavar con agua y teñir durante 1 min con safranina al 0,1 %, acidificada por 1 % de ácido acético. Lavar con agua, deshidratar y montar. La hemoglobina queda de color azul oscuro o gris azulado, los núcleos quedan rojos y los citoplasmas rosados.

La reacción de las peroxidadas no es específica de la hemogloblina; también la presentan la metahemoglobina, la hemateína y el hemocromógeno. La hematoporfirina, la hematoidina y la hematosiderina, por el contrario, no dan reacción positiva a las peroxidasas.

La hemoglobina es acidófila, eosinófila, safraninófila, siderófila.

c) **Hemosiderina.** — Este compuesto se llama también pigmento ocre, rubigina, siderina. Generalmente es intracelular.

Se encuentra en los órganos de los palúdicos, de los enfermos de cirrosis de Hanot, etc. No es soluble con la potasa y da la reacción del hierro positiva (azul de Turnbull). Es soluble en los ácidos diluidos y no se tiñe ni con los colorantes básicos de anilina ni con los colorantes específicos de los lípidos. No se destiñe con los oxidantes y no es argentafín. Su principal característica es la presencia de hierro, fácilmente reconocible, con el método del azul de Turnbull. No debe confundirse este pigmento ni con los cromolipoides (que también pueden dar reacción positiva al hierro), ni con las melaninas (que son argentafines), ni con la hematoidina (ver más arriba).

El estudio de los pigmentos ferruginosos es particularmente difícil. Debe actuarse sobre material cuanto más fresco mejor, habiendo permanecido muy poco tiempo en fijador. No siempre los resultados negativos indican la ausencia de hierro, que puede estar enmascarado, combinado con diversas sustancias. Evitar los ácidos, dado que disuelven el hierro. Todos los reactivos empleados deben carecer de hierro, sobre todo el agua destilada. Las sales de calcio fijan las mínimas cantidades de hierro y las visualizan. Vigilar los papeles de filtro y emplear únicamente varillas o agujas de vidrio.

Tinción de Perls. — Tiñe de color azul oscuro la *hemosiderina. Preparar* la solución madre de fucsina: fucsina: 1 g + ácido acético: 1 ml + agua: 200 ml.

Emplear: Fucsina, solución madre: 5 ml + ácido clorhídrico 22 Bé: 4 ml + agua: 55 ml.

Lavar los portaobjetos con agua corriente 10 min; teñir con una solución saturada de ferrocianuro de potasio: 20 mm. Sin lavar, sumergir los portaobjetos en fucsina clorhídrica 5 min; diferenciar con agua clorhídrica. Lavar, deshidratar y montar.

d) **Bilirrubina o hematoidina.** — En antiguos focos hemorrágicos se encuentran cristales en forma de romboedros o de finas agujas que se designaron bajo el nombre de *hematoidina:* se ha demostrado que se trata de bilirrubina. Estos cristales son insolubles en agua y poco solubles en alcohol, éter, ácido acético, *muy solubles* en el *cloroformo* y en el *sulfuro de carbono*. Son solubles en amoníaco, en potasa y en sosa. El ácido nítrico actúa como oxidante: los cristales se rodean de una zona verde, debido a la transformación de la bilirrubina en biliverdina (reacción de Gmelin). Este compuesto no da reacción al hierro, se encuentra también en estos focos hemorrágicos, pigmento ferruginoso que se pone de manifiesto con la reacción del azul de Turnbull. La hematoidina generalmente no es intracelular, se trata de un producto patológico.

Reacción de Stein. — Fijar con formol al 10 % o con Helly. *Cortar* en parafina. Utilizar un *mordiente*, una solución alcohólica yodada durante 6 a 12 h (2 o 3 partes de Lugol por una parte de tintura de yodo). *Lavar* con agua destilada y *desteñir* en 15 a 30 s por hiposulfito sódico al 5 %. *Lavar* nuevamente con agua destilada y *teñir* con carmín alumínico, de 1 a 3 h. Lavar con agua destilada, deshidratar con acetona, xilol, bálsamo. Los granos de pigmentos biliares quedan teñidos de color verde esmeralda. La reacción es específica.

Los *pigmentos sanguíneos* se tiñen intensamente de color rojo o azul por el Ziehl o por el policromo azul, seguido de una diferenciación con una solución acuosa concentrada de tanino. La melanina no se tiñe con el Ziehl y adquiere una tonalidad verde esmeralda con el policromo azul.

e) **Pigmento palúdico o hemozoína.** — Este pigmento es casi siempre intracelular. Se presenta bajo forma de pequeñas granulaciones negro parduscas, insolubles en agua y en los ácidos diluidos, en veinticuatro horas queda totalmente disuelto con alcohol sulfúrico (a 40-50°), solubles en las soluciones alcalinas y en la potasa alcohólica, en el sulfuro amónico, no se destiñen con los oxidantes (permanganato potásico, agua oxigenada).

La hemozoína no da *reacción positiva al hierro ni reacción argentafina* y no se destiñe con los colorantes lipídicos, por lo que se diferencia inmediatamente de las melaninas y de los cromolipoides.

Los fijadores formolados pueden dar precipitados parduscos que se parecen a la hemozoína (debe aplicarse la técnica de Verocay para disolver estos precipitados) y presentan casi todas sus propiedades químicas. La diferenciación será por consiguiente de tipo eminentemente morfológico: los precipitados se distribuyen anárquicamente y sin una localización concreta, mientras que la hemozoína está casi siempre localizada en los hematíes, en los monocitos o en las células del retículo endotelial.

Se utilizará también otra técnica que se basa en un carácter óptico importante de la hemozoína: *su birrefringencia.* El trabajo más interesante y completo que conocemos sobre esta cuestión es el de Voorhoeve (1937) (Hospital Martabing Tebing Tinggi, Deli, Sumatra). Según sus investigaciones, la hemozoína es un componente semiisótropo uniáxico con birrefringencia positiva, micelar, en el que el eje óptico coincide con el eje longitudinal cuando se presenta en forma de bastoncillos *(Plasmodium vivax).*

Esta birrefringencia es bastante difícil de observar a

causa de la escasa transparencia de la hemozoína y del escaso tamaño de los gránulos, por lo que debe emplearse una iluminación muy potente. Mientras unas cuantas granulaciones y bastoncillos se aprecian iluminados entre nicoles cruzados los otros permanecen oscuros; si los nicoles no se cruzan del todo, de forma que los gránulos isótropos todavía puedan apreciarse, basta con girar ligeramente la platina para que estos últimos queden iluminados. En el caso de los bastoncillos, se ve muy bien que permanecen oscuros cuando su eje longitudinal se halla paralelo al de uno de los dos nicoles; por el contrario, se iluminan cuando su eje es de 45° del de los nicoles. Algunos gránulos no se iluminan en ninguna de las posiciones adoptadas por la platina o los nicoles: probablemente se trata de cortos bastoncillos cuyo eje longitudinal es paralelo al eje óptico del microscopio. Cuando dos gránulos del mismo tamaño y de la misma opacidad se iluminan de forma desigual, es que sus ejes no forman el mismo ángulo con el eje de la platina.

La birrefringencia de este pigmento no es ni una birrefringencia de tensión, ni una birrefringencia de difracción, ni de cristalización, se trata de una birrefringencia *micelar*. Parece ser que la hemozoína desde el punto de vista óptico es semiisótropa.

f) **Citocromo.** — El *citocromo* de Keilin es un pigmento tetrapirrólico con un grupo ferruginoso y con función peroxidásica. Equivalen a las mio e histohematinas de Mac Munn.

El descubrimiento de este pigmento ha sido efectuado por microespectroscopia y su estudio debe hacerse por este mismo sistema. Las estructuras que dan mejor resultado son los músculos torácicos de las alas de insectos, el tórax de la galera *(Galleria mellonella)*, la levadura de la panadería, etc.

El espectro de absorción presenta cuatro bandas cuyos máximos, en unidades ångström: $a = 6046$; $b = 5665$; $c = 5502$; $d = 5210$. Este espectro es el del citocromo *reducido*; tras oxidación, únicamente hay dos bandas apenas perceptibles. Por otro lado, el citocromo es más fácil de oxidar y de reducir.

Químicamente el citocromo se comporta como una peroxidasa y forma parte del complejo de catalizadores oxidantes. Todas las estructuras que contienen citocromo dan una reacción peroxidásica estable en caliente. Esta reacción sólo da resultado positivo cuando se eliminan las sustancias inhibidoras (la catalasa se destruye a los 100°).

g) **Hemina.** — La hemina o clorhidrato de hematina tiene un gran interés práctico: permite determinar la presencia de sangre cuando ésta no es observable al estudio microscópico directo. Si por ejemplo se trata de sangre desecada, debe humedecerse con una solución muy débil (del 0,5 al 0,1 %) de cloruro sódico y se deja *secar completamente*. Se añade ácido acético cristalizado. Se evapora calentando ligeramente, sin que llegue a hervir, y se deja enfriar. Se produce una doble descomposición que da lugar al acetato de sodio y al ácido clorhídrico, éste se combina con la hematina para formar la hemina, que precipita a modo de cristales romboidales con ángulos agudos, frecuentemente agrupados en forma de cruz o estrellada, de color pardusco *(cristales de Teichmann)*. Debe actuar bajo el cubreobjetos para que la evaporación sea más lenta y así obtener cristales más voluminosos. Estos cristales son birrefringentes y se iluminan con nicoles cruzados. Sarda y Dusser, y posteriormente Locard, han mejorado considerablemente este procedimiento, sustituyendo el cloruro sódico por el yoduro sódico o potásico, que da unos cristales muy voluminosos de *bromohidrato de hematina.*

Gabriel Bertrand propuso un nuevo reactivo, mucho más fácil de emplear que los anteriores para la obtención de cristales de Teichmann: cloruro o bromuro magnésico: 1 g + agua destilada: 1 ml + glicerina: 5 ml + ácido acético cristalizado: 20 ml.

La consistencia de jarabe de este líquido impide extenderse tan fácilmente como cuando se utiliza el ácido acético. Es mucho menos volátil y no origina cristales gigantes.

Para usarlo debe depositarse una gota sobre una zona visible de la mancha a identificar, se pone un cubreobjetos y se calienta con precaución sobre la llama.

M. Gouillart ha demostrado que los cristales de Teichmann derivan de cristales de protoyodohema, por simple calentamiento; éstos se forman lentamente en frío, por acción del ácido acético al ácido clorhídrico o de yoduro potásico. Por consiguiente, para obtener abundantes cristales de Techmann, es preferible actuar en dos fases: 1.° en frío, durante un cierto tiempo, para obtener el protoyodohemo; 2.° calentar rápidamente (1 a 2 s) y fuertemente, a fin de provocar una brusca transformación del protoyodohemo en protoyodohemina o cristales de Teichmann. El calentamiento prolongado transformaría la mayor parte de la hemoglobina en porfirinas no cristalizables.

Reactivo de Gouillart. — El ácido acético con un 1 % de ácido clorhídrico se conserva mientras que la solución a base de yoduro potásico es inestable. Por ello debe prepararse justo antes de usar, disolviendo por ebullición algunos cristales de yoduro potásico en un poco de ácido acético. El ácido yodhídrico producido se disuelve en gran parte en el ácido acético. Gouillart considera este reactivo como el mejor y el más sensible, permitiendo obtener una reacción característica con un solo hematíe de rana.

A partir de estos principios M. Gouillart diseñó el siguiente método, *estrictamente específico de la hemoglobina.*

FROTIS O EXTENSIONES. — La extensión bien seca se lava con alcohol absoluto (o con cloroformo si hay lípidos). Tras evaporación depositar sobre el portaobjetos una gota del reactivo de Gouillart y depositar un gran cubreobjetos. No calentar, dejar que se produzca una reacción lenta. Observar con nicoles cruzados, se aprecian los cristales de protoyodohemo en el interior de los hematíes.

CORTES. — Fijar el fragmento de tejido con agua salada hirviendo: la hemoglobina forma un coágulo pardo-rojizo, no cristalizado. Cortar por congelación y extender en agua lo mejor posible. Colocar sobre el corte una gota del reactivo de Gouillart y recubrir con un cubreobjetos de grandes dimensiones. La reacción tiene lugar en frío.

MONTAJE DE LAS PREPARACIONES. — En el caso de las extensiones sacar con precaución el cubreobjetos bajo el agua y montar con jarabe gomoso de Apathy, o bien dejar secar totalmente y montar con aceite de cedro (no debe utilizarse ni el xilol ni el toluol, dado que los cristales se disolverían). En el caso de los cortes, lavar con agua y montar con el jarabe gomoso de Apathy.

La reacción de los cristales de yodhidrato de hemateína o *cristales de Strzysowski* es más sensible y más rápida que la de los cristales de Teichmann, pero requiere utilizar el ácido yodhídrico, reactivo de difícil obtención.

Para *caracterizar la sangre en la orina*, mediante los cristales de Teichmann, es preferible utilizar en primer lugar el *reactivo de Florencia* (solución acuosa saturada de ácido pícrico al que se le ha añadido un 1 % de ácido acético cristalizable). Añadir a la orina un 10 % de este reactivo, recoger el precipitado en un filtro sin pliegues, lavar ligeramente, dejar secar el filtro entre dos hojas de papel secante. Recortar un fragmento del papel de filtro y secarlo sobre un portaobjetos de manera que quede un poco de precipitado. Añadir una gota de ácido acético saturado de cloruro sódico. Recubrir con un cubreobjetos y calentar suavemente la llama hasta que aparezcan algunas burbujas. Dejar enfriar del todo y observar al microscopio. Este método da resultados muy constantes y puede adaptarse fácilmente a otros materiales distintos a la orina.

5.º Vitamina C (ácido ascórbico). — *Método de Giroud y Leblond* (según Lison). 1.º *Eliminar el cloruro* mediante un lavado con una solución isotónica de fructosa; 2.º *nitrar* mediante el nitrato o acetato de plata al 10 % acidificado con tres gotas de ácido acético; *trabajar en la oscuridad* sobre los órganos frescos; si es posible es mejor inyectar por vía vascular; 3.º *eliminar* la plata no reducida con agua destilada y seguidamente con un hiposulfito sódico al 5 %; 4.º *lavar* nuevamente y cortar por congelación o incluir en parafina.

Tuba, Hunter y Osborne emplean para visualizar o detectar la vitamina C el colorante de Smyth, Bingley y Hill: ácido acético al 5 %: 5 ml + nitrato de plata al 5 %: 100 ml.

Debe prepararse cada vez con reactivos nuevos y puros, así como la solución de hiposulfito sódico al 5 %. Guardar en la nevera y en la oscuridad.

Estudiaron particularmente bien los frutos de gavanza (*Rosa acicularis* Lindl.), incluidos en parafina. Cortar hasta llegar al fruto y en este momento sumergir el bloque durante media hora en el reactivo y en la oscuridad, a continuación debe lavarse cuidadosamente con la solución de hiposulfito, lavar y volver a cortar, obteniendo secciones de 14 a 45 μ. Observar en el líquido de Farrant.

Para localizar el ácido ascórbico en los tejidos vegetales, V. Massa utiliza el ferricianuro férrico (reacción de Tauber).

Preparar: Solución A. — Ferricianuro potásico: 0,2 g + ácido acético cristalizado: 15 g + agua destilada hasta 100 ml.

Solución B. — Cloruro férrico oficinal: 10 ml + ácido acético cristalizado: 15 ml + agua destilada hasta 100 ml + permanganato potásico, solución 0,1 N hasta que adquiera una tonalidad ligera.

Antes de emplear, mézclese en partes iguales A y B. Es muy importante que los cortes sean delgados (con 1 o 2 capas de células), montar sobre el portaobjetos en una gota del reactivo y obsérvese enseguida. El *ácido ascórbico* provoca la aparición endocelular de delicadas granulaciones de azul de Prusia de un nítido color azul y fácilmente visibles.

Los compuestos fenólicos, tánicos, antocianos, pigmentos flavonoides determinan una coloración verde oscura o un precipitado verde negruzco.

Los compuestos sulfidrilos, glutatión, cisteína, también reducen el ferricianuro, pero pueden diferenciarse por la reacción del nitroprusiato de sodio, con el que dan una hermosa coloración púrpura, mientras que el ácido ascórbico toma una tonalidad azul virando a rojo ladrillo.

Los carotinoides, vitamina A, tocoferol, reducen el ferricianuro mucho más lentamente que el ácido ascórbico, el cual da una respuesta inmediata.

W. Schopfer ha observado que el *tricrómico* provoca una deshidrogenización (oxidación) de la aneurina (tiamina), dotada de una intensa fluorescencia azul, se trata de un fluorocromo vital, no tóxico, con una acción muy potente. Penetra fácilmente en las células (epidermis superiores de escamas de bulbos de *Allium*) y puede usarse como indicador fluorescente intracelular, permitiendo visualizar la penetración del ácido ascórbico.

6.º Vitamina A β caroteno). — Para estudiar la localización citológica de la vitamina A, Joyet-Lavergne utiliza la solución clorofórmica saturada de tricloruro de antimonio (reactivo de Carr y Price) que al reaccionar con la vitamina A da una tonalidad azul. Cuando el material está altamente desecado, caso de las semillas, granos de polen, puede estudiarse tal cual, directamente con este reactivo. Los restantes materiales deben ser fijados preferentemente con formol-Ringer (15 cc de formol + 85 cc de Ringer), y después de haber sido cuidadosamente deshidratados por una serie ascendente de alcoholes, debe tratarse el material durante quince minutos con el reactivo, hasta dos o tres horas, atendiendo al tipo de material en estudio y observar montado en xilol. Posteriormente, puede incluirse en parafina y una vez obtenidos los cortes pasarlos directamente en el reactivo.

III. — TÉCNICAS ESPECIALES UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA VEGETAL

ESPORAS Y QUISTES

Las esporas vegetales y los quistes animales son formas celulares de reproducción que generalmente tienen en común una determinada diferenciación de sus paredes y ello motiva que sean bastante impermeables. A fin de que los colorantes penetren y las células se mantengan vivas, generalmente deben pasarse rápidamente, o bien en alcohol diluido o en agua sulfúrica al 0,01 % y lavarlas rápidamente. No es aconsejable emplear otros agentes tensoactivos si se quiere proceder a efectuar tinciones vitales.

Las paredes son generalmente complejas y frecuentemente ornamentadas; hay una gran heterogeneidad en la nomenclatura usada. Únicamente los palinólogos se han planteado el problema y piensan en la posibilidad de uniformar las nomenclaturas. La tabla publicada por Locquin (1977) resume la nomenclatura internacionalmente adoptada en el caso de las paredes de las esporas.

TÉCNICAS VEGETALES

La célula vegetal se diferencia esencialmente de la célula animal por su esqueleto rígido y refringente constituido por las paredes celulares más o menos desarrolladas. Esta arquitectura especial ofrece a los tejidos vegetales particulares propiedades físicas a la vez que condiciona una menor permeabilidad respecto a los fijadores. Por ello haremos una serie de observaciones al respecto.

Es esta misma naturaleza esquelética vegetal a la que acabamos de referirnos la que permite la utilización del microscopio de luz polarizada para el estudio estructural de las paredes, con un rendimiento muy aceptable, mientras que dificulta su observación con el microscopio de contraste de fases y en ocasiones la del microscopio de contraste interferencial. Apretando suave pero firmemente los tejidos vegetales se obtiene con frecuencia una mejor imagen del conjunto.

Los orgánulos citoplasmáticos con pigmentación propia, como son los cloroplastos y cromoplastos se superponen a la de los orgánulos incoloros, enmarcándolos parcialmente. Así, para hacer un estudio de pared se buscarán modelos pobres en cloroplastos, o plantas que hayan permanecido bastante tiempo a la oscuridad. También pueden someterse los cortes a un tratamiento con lejía, caliente a fin de que ésta destruya todo contenido citoplasmático, manteniéndose únicamente las paredes.

Los reactivos generales utilizados en histología vegetal son prácticamente los mismos que se recomiendan para la fijación del material animal. A fin de que haya una mayor penetrabilidad es aconsejable que el material pase previamente por alcohol absoluto, cloroformo, a fin de que se disuelvan las ceras y grasas que impermeabilizan las paredes. Por ello aconsejamos los fijadores alcohólicos.

Cuando los tradicionales métodos de inclusión en parafina dan malos resultados aconsejamos la *inclusión en goma arábiga glicerinada* según la técnica de Leins (1968). Se mezclan: agua: 6 ml + glicerina: 4,5 ml + goma arábiga: 11 g + algunos cristales de fenol. El material, lavado en agua se pasa seguidamente en una solución diluida diez veces y después se coloca en una gota de goma glicerinada. Se deja secar unos ocho días a temperatura ambiente hasta que el bloque pueda ser rayado con la uña. Se corta con un micrótomo que posea una cuchilla de vidrio, diseñado por M. Hideux y L. Marceau (1972).

La inclusión en alcohol polivinílico se lleva a cabo con la mezcla: alcohol polivinílico 60 % + ácido acético: 6 % + glicerina 5 % + agua hasta 100 ml. Se diluye este medio al 10 % y se deja en él el material durante unas horas o unos días y después se pasa a la solución concentrada, se deja endurecer el aire durante varios días, pudiéndose acelerar este endurecimiento si se coloca a la estufa a 70°, según M. Hideux (1971).

En ocasiones resulta aconsejable fraccionar el material en lugar de cortarlo. Con esta finalidad, M. Cerceau-Larrival utiliza los ultrasonidos a 40 kilohertz.

La *destrucción del citoplasma* a fin de dejar únicamente visibles las paredes celulares es frecuentemente utilizada en histología vegetal. Durante muchos años se ha ido utilizando el hipoclorito sódico o lejía. Para trabajos más precisos es preferible utilizar la acetólisis según Erdtman. Debe prepararse con precaución una mezcla formada por 9 partes de anhídrido acético más una parte de ácido sulfúrico. Una vez introducido el material en esta mezcla se lleva a un baño maría graduado a 100°, durante 3 a 15 min. Se centrifuga, posteriormente se lava con ácido acético a fin

de solubilizar los compuestos acetolizados (puede conservarse en este líquido); decantar o centrifugar; lavar con agua destilada; centrifugar; eventualmente puede clorarse, en el caso de querer transparentar los tejidos opacos; pasar por agua glicerinada al 50 %, centrifugar largamente (media hora); montar en un medio hidrosoluble; cementar. Si se desea teñir las paredes con la pararrosanilina o la safranina se añadirán unas gotas de estos colorantes en el agua glicerinada, antes de montarlos.

Baño de hipoclorito. — Este baño es imprescindible para aclarar los cortes no teñidos de los materiales destinados a estudiar sus paredes celulósicas y para estudios de anatomía vegetal; se trata de vaciar el contenido citoplasmático y reducir los tejidos a su esqueleto pectocelulósico o lignificado. Es preferible utilizar el hipoclorito sódico o potásico más que la lejía ordinaria, ya que ésta contiene múltiples impurezas de hipoclorito de cal. De todas formas, podría provocarse la precipitación de la cal precipitándola con el carbonato de sodio o potásico y emplear el líquido resultante, previa filtración.

El hipoclorito no debe actuar durante un tiempo excesivamente largo, sobre todo en el caso de estudiar tejidos jóvenes, ya que éstos podrían destruirse. Es por ello que la permanencia en este baño de hipoclorito variará de unos segundos a cinco o 10 minutos, según los casos. Cuando los cortes procedan de muestras desecadas debe trabajarse en caliente. Para ello se coloca el vidrio de reloj con los cortes sobre una platina calefactora tipo Malassez o bien directamente a la llama del Bunsen, vigilando; se retirarán los cortes en el momento que aparezcan totalmente transparentes. Lavar seguidamente con agua acidulada por la presencia de unas gotas de ácido acético o en bisulfito sódico diluido y finalmente en agua corriente.

Tinción. — Para los *estudios citológicos* se emplearán las mismas técnicas recomendadas para los trabajos de citología animal.

Para las *tinciones vitales* véanse las indicaciones dadas en la página 248; generalmente los colorantes vitales empleados en histología vegetal son los mismos que se utilizan para el estudio de las células animales. Los colorantes *no tóxicos* susceptibles de utilizarse como colorantes vitales son todos colorantes básicos. El *rojo neutro* es el colorante vital por excelencia, ya que una vez la célula muere difunde fácilmente por el citoplasma y el núcleo. Se trata de un colorante eminentemente vacuolar; cuando una célula presenta sus vacuolas teñidas por el rojo neutro es muy probable que se trate de una célula viva. El rojo neutro actúa de indicador del pH del contenido vacuolar, tiñéndolo de color azul o rojo. Únicamente da color rojo cuando el jugo vacuolar está próximo a la neutralidad. Por el contrario, el *verde Janus* es un colorante específico del condrioma, pero es tóxico, actúa cuando la célula está moribunda, se trata de un colorante supravital o posvital. Las *oxacinas* (azul de cresil de Nilo) actúan como el rojo neutro, siempre que se utilicen en proporciones muy diluidas. Los *colorantes ácidos* son siempre tóxicos y tienen escasa penetrabilidad, salvo el rojo de bencil intenso que penetra instantáneamente y mata la célula, tiñendo el citoplasma.

Para los *estudios anatómicos* se aplicarán los siguientes métodos que permitirán teñir simultáneamente las paredes de celulosa, así como las lignificadas y suberificadas.

1.° **Carmín-verde yodo.** — El método clásico es la doble tinción con carmín alumínico y verde yodo (o azul de metileno alumínico).

Teñir durante una hora o menos con carmín alumínico de Grenacher. Lavar rápidamente con agua. Teñir durante algunos segundos en un vidrio de reloj que contenga unos centímetros cúbicos de agua a la que se le ha añadido un poco de verde yodo. Montar en glicerina gelatinada, con el jarabe gomoso de Apathy o deshidratar y montar con bálsamo del Canadá.

R. Mirande ha demostrado que estos dos colorantes actúan sólo con la presencia de compuestos pécticos en los tejidos estudiados; efectivamente, el carmín no es un colorante específico de la celulosa y el verde yodo no tiñe la lignina.

Las *estructuras lignificadas* quedan teñidas de color verde intenso, el resto de color rojo carmín; las preparaciones quedan muy bien y el contraste entre los dos colorantes es perfecto. Un resultado muy parecido puede obtenerse con el verde brillante y la deltapurpurina.

A fin de diferenciar rápidamente la tinción con el verde yodo, M. Pesez, aconseja el ácido clorhídrico diluido a la mitad. Seguidamente se lava con agua ligeramente amoniacal. Este método es válido cuando se trabaja con otros colorantes verdes básicos [verde brillante, verde de metilo, verde malaquita (oxalato)].

2.° **Azul de metileno y rojo de rutenio.** — A nuestro juicio, este método da resultados todavía más hermosos que el anterior, y puede fácilmente aplicarse sobre cortes en parafina adheridos previamente a los portaobjetos.

1.° Teñir durante 5 a 10 min en el azul de metileno alumínico (1 g de azul de metileno + alumbre: 10 g + agua: 100 ml), lavar con agua.

2.° Teñir durante 5 a 10 min en una solución al 0,1 % de rojo de rutenio. Esta sal (sesquicloruro de rutenio amoniacal) ha sido descubierta por Joly. Su precio es muy elevado, se vende por decigramos, bajo forma de un polvo pardo rojizo, soluble en agua y en una solución de alumbre, pero no en alcohol ni en glice-

rina. Sus propiedades tintoriales posiblemente se deban al radical NH.

La tinción resiste la deshidratación con alcohol absoluto pero no a los ácidos minerales. Este reactivo precipita por acción del ácido pícrico, únicamente tiñe las estructuras basófilas, así como las que resultan ser Gram negativas. La tinción es óptima cuando se ha utilizado un líquido fijador que contenga cromo. La adición de ácido acético a la solución da una tinción nuclear pura.

Dado que la solución acuosa de rojo de rutenio no se conserva debe prepararse justo antes de usar, añadiendo trazas de rojo de rutenio en algunos centímetros cúbicos de agua destilada en un vidrio de reloj, hasta obtener un líquido de color rojo intenso.

3.° Montar un bálsamo del Canadá, en jarabe gomoso de Apathy o bien en glicerina gelatinada.

El *súber* queda teñido de color verde, el *esclerénquima* de color violeta, el *leño* de color azul, los *parénquimas* en rosa más o menos intenso.

3.° **Método de Petit.** — Teñir el *súber* de rojo con la *alcanina*, lavar rápidamente con alcohol y teñir el *leño* de verde con el verde yodo alcohólico, lavar posteriormente con alcohol; teñir la *celulosa* en amarillo aplicando sucesivamente soluciones acuosas saturadas de acetato de plomo y de dicromato potásico, con un lavado en agua destilada entre los dos colorantes. Montar en glicerina gelatinada o en jarabe gomoso de Apathy o en bálsamo del Canadá.

4.° **Violeta neutro de Godfrin.** — Preparar una solución acuosa de violeta neutro al 0,02 %. Los *compuestos pécticos* se tiñen de color rojo pardusco, el *leño* y el *súber* de violeta oscuro. La *celulosa,* la *callosa* y la *cutina* no quedan teñidas. La aplicación de este único reactivo permite diferenciar y caracterizar a la perfección todos los elementos del corte.

5.° **Azul de molibdeno.** — Bajo esta denominación, Géneau de Lamarlière designa un sesquióxido de molibdeno que se obtiene al tratar el fosfomolibdato amónico con el bicloruro de estaño o con hiposulfito sódico. Este líquido tiñe los núcleos y preferentemente los compuestos pécticos, aunque su acción no sea idéntica sí es comparable a la del rojo de rutenio. No tiñe ni las grasas, ni el almidón, ni la callosa, ni siquiera la celulosa.

6.° **Método de Bugnon.** — A las perseverantes búsquedas tintoriales de Bugnon debemos una serie de métodos rápidos y precisos para poner de manifiesto y de forma diferencial las paredes celulares, atendiendo a su naturaleza química.

Estos métodos se basan en parte en el empleo del verde luz como colorante específico de las *paredes lignificadas* y en el empleo de tintas comerciales que tiñen las paredes *pectocelulósicas*. Con estos colorantes, solos o combinados con otros, es posible llevar a cabo una serie amplia de tinciones dobles o triples.

a) Verde luz-Sudán III. — Preparar una solución saturada de estos dos colorantes en alcohol de 70°. Teñir en esta mezcla, durante 10 min, los cortes previamente sometidos a la acción del hipoclorito; diferenciar con agua; montar. El *leño* se tiñe de verde, el *súber* y las partes *cutinizadas* de rojo.

b) Verde luz-Sudán-Hemalumbre. — Teñir durante 10 min con verde luz-Sudán III, diferenciar por lavado en agua y seguidamente teñir las paredes pectocelulósicas durante 10 min en hemalumbre.

En lugar de hemalumbre puede utilizarse la solución acuosa saturada de *benzoazurina* durante 10 min o el *dicromato de plomo* y el *dicromato potásico,* haciendo un lavado en agua entre uno y otro reactivo, como en el caso del método de Petit.

c) Tinta-Verde luz-Sudán III. — Las tintas que mejor resultado han dado a Burgnon son: la tinta de Antonio, llamada también del estado civil, al tanino y al sulfato de hierro y la tinta moderna de Antonio, a base de palo de campeche. Esta última tiene la interesante propiedad de asociarse muy fácilmente con la triple mezcla de Sudán III y un verde (verde luz o verde yodo). De esta manera, pasando por una única solución tintorial se obtiene la triple tinción: paredes *lignificadas* en verde; paredes *cutinizadas* y *suberificadas* en rojo anaranjado, paredes *pectocelulósicas* en violeta.

Dobles tinciones. — Teñir en primer lugar con la safranina anilada o con el pardo Bismarck, diferenciar con alcohol clorhídrico al 5 % y después teñir con tinta o tanato de hierro. Este método es muy adecuado para la tinción de cortes seriados y es recomendable montarlos con bálsamo del Canadá.

Triples coloraciones. — En *dos tiempos* con la tinta o tanato de hierro. Inicialmente se tiñe con la mezcla de verde luz-Sudán III, por ejemplo, diferenciando con agua y posteriormente se tiñe suavemente con la tinta.

En *un tiempo* con la tinta o el campeche.

Mezclar un 10 % de tinta con una solución saturada de Sudán III y de verde luz en alcohol de 70° (se conserva bien). También pueden añadirse 100 ml de solución saturada de Sudán III en alcohol de 90°, 0,5 g de verde yodo y 5 ml de tinta (esta mezcla no se conserva). El verde luz ofrece mejor contraste con la tinta, pero la conservación no es tan duradera como las teñidas con verde yodo. Estas tinciones en un tiempo son particularmente recomendadas para clases prácticas.

7.° **Método de Kühnholtz-Lordat a base de ácido láctico.** — Tinción instantánea en caliente de las endodermis suberificadas y de las grasas con el ácido láctico saturado en caliente por el Sudán. Tinción instantánea en frío de las endo-

dermis amilíferas por el ácido láctico al que se le ha añadido Lugol *(ad libitum)*.

Colorantes de los lípidos. — Son principalmente el rojo Sudán azulado y el negro Sudán azulado, disueltos en alcohol, de 70°, el azul BZL disuelto en caliente en alcohol de 50°. Por acción sucesiva del verde yodo y del rojo Sudán B, el *leño* queda teñido de verde y el *súber* y la *cutícula* de rojo.

El azul BZL tiñe las zonas *suberificadas* de color azul índigo bastante claro. Para todas estas técnicas es recomendable que el material a estudiar haya sido previamente tratado con hipoclorito.

Montaje del material no teñido. — Cuando simplemente se trate de estudios anatómicos, no es imprescindible someter el material a una previa tinción. La mayoría de los materiales pueden ser observados y montados sin teñir, esto es válido tanto para el caso de cortes como para la observación de pequeños órganos y de plantas enteros.

Para estos casos recomiendo vivamente el empleo de los *métodos de Amann* que dan excelentes resultados y son muy rápidos (cf. pp. 117 y 118).

Tinción de cortes seriados. — Para los trabajos citológicos emplear las técnicas recomendadas en citología animal, a continuación detallamos dos excelentes métodos para los estudios anatómicos.

1.° **Safranina-Hemalumbre.** — Los cortes tratados por alcohol se tiñen varias horas en: safranina 1 % en alcohol del 50 %, diferenciar con alcohol clorhídrico al 0,25 % hasta que las partes lignificadas y cutinizadas sean las únicas visibles; lavar con agua y después teñir durante algunos minutos con hemalumbre o gliceroalumbre, siguiendo la técnica anteriormente descrita. Deshidratar y montar en bálsamo del Canadá. La *celulosa* queda violácea, el *leño* y el *súber*, así como las partes *cutinizadas* quedan de color rojo.

2.° **Safranina-Azul de metilo.** — Teñir, como en el caso anterior, con safranina alcohólica. Diferenciar, lavar con agua y después teñir con azul de metilo al 1 %; calentar suavemente hasta la emisión de vapores; lavar con agua, deshidratar y montar en bálsamo. La *celulosa* queda azul, las partes *lignificadas, suberificadas* y *cutinizadas* quedan rojas.

3.° **Safranina-Verde luz.** — Teñir de 2 a 24 h con la safranina anilada, diferenciar con alcohol de 50° y deshidratar con alcohol absoluto. Teñir de 3 a 30 minutos con el verde luz disuelto en esencia de girasol. Lavar con xilol disuelto en un 2 a 3 % de alcohol absoluto. Montar.

4.° **Safranina o pardo Bismark y tinta férrica.** Véanse los métodos de Bugnon (p. 260).

5.° **Verde malaquita o azul de metilo o rojo Congo.** — Teñir durante seis o más horas en el verde de malaquita o con el azul de metilo al 1 % en solución acuosa, después lavar con agua. Teñir con el rojo Congo al 1 % durante 15 a 30 min y lavar con agua. Diferenciar con alcohol de 80°, deshidratar y montar.

Tinción del látex. — **Congelación.** — Para evitar las pérdidas del látex es preciso congelar la pieza y cortar antes de separarla del tejido. Coger al menos un segmento de 4 a 5 cm. Congelar 1 cm con la nieve carbónica o con el anhídrido carbónico líquido: con éste basta 5 o 10 s para una pieza de 3 mm de diámetro.

Cortes. — Montar una sección de 5 mm de longitud, sin que se descongele. Cortar con una cuchilla enfriada por la nieve carbónica. Para que los cortes no se quiebren el material no debe congelarse en exceso, ni tampoco la cuchilla. Obtener cortes de 20 a 100 µm, procurando que todos tengan el mismo grosor, a fin de poder establecer comparaciones en el momento de estudiarlos.

Sacar con sumo cuidado los cortes, mediante unas pinzas enfriadas previamente con un pincel humedecido y depositarlos en el *coagulante-colorante*, donde se descongelarán.

Azul calco al aceite NA: 0,5 g + alcohol de 50°: 100 ml. Únicamente se disuelve una parte: decantar y filtrar. Para preparar la solución coagulante-colorante debe mezclarse:

Solución alcohólica de azul calco: 95 ml + ácido acético cristalizable: 5 ml.

El ácido acético actúa de coagulante. Si la solución se enturbia debe calentarse suavemente.

Montaje. — Fenol: 0,1 g + caro blanco: 66 g + agua destilada: 33 g.

Tinción del látex por los métodos de Addicott. — Cortar los tallos en fragmentos de 3 a 5 mm. Fijar durante 24 a 48 h con una mezcla de formol-etanol-ácido propiónico. *Cortar* por congelación y obtener secciones de 50 a 100 µ, el material incluido en goma arábiga al 40 %; pasar los cortes por etanol a 50°, y dejarlos 5 min en acetona, a fin de extraer las resinas; *blanquear* con el clorato sódico al 1 % durante 5 min; *saponificar* con potasa al 10 % en alcohol de 95° durante 15 min para extraer la suberina y lavar tres veces con alcohol de 50°; *teñir* con la mezcla azul liposoluble-safranina-rojo Congo, durante 30 min a 55°; lavar dos o tres veces en alcohol de 50° y montar.

El *látex* queda azul, el *leño* y el *súber* rojos, la *celulosa* y el *citoplasma* rosas.

Preparar: Azul al aceite NA *(Calco)*. — Disolver 0,5 g de azul en 10 ml de alcohol butílico terciario y después añadir 190 ml de alcohol de 50°. Agitar varias veces y después filtrar.

Safranina:	Safranina	0,4 g
	Metilcelulosa	200 ml
	Alcohol de 95°	100 ml
	Agua destilada	200 ml
	Acetato sódico	4 g
	Formol	8 ml
Mezcla tintorial:	Solución de azul	50 ml
	Solución de safranina	1 ml
	Rojo Congo	0,2 a 0,4 %

Paredes vegetales. — En lo referente a las paredes, la mayoría de nuestros conocimientos básicos se deben a los trabajos llevados a cabo por Mangin. Para las técnicas generales remítanse a las indicaciones dadas en la página 258.

La *hidrólisis básica* se hace siguiendo el método de Von Post, a la potasa al 5 % por ebullición, o el de R. Kühner a la autoclave a 120°. Se centrifuga, se lava con ácido clorhídrico diluido y después con agua destilada varias veces; el resto de las operaciones se hace como con la técnica de la acetólisis (ver p. 259).

La *hidrólisis ácida* se hace con el ácido sulfúrico al 80 % a 100°. Se diluye en agua, se lava varias veces y puede conservarse en ácido acético; el resto del procesado es igual como en el caso anterior.

Prótidos. — Estos compuestos no dan reacciones siempre bien caracterizadas, deben emplearse varios reactivos a fin de tener una seguridad en el diagnóstico. Es conveniente fijar inicialmente el material con alcohol absoluto, el cual endurece los tejidos a la vez que disuelve un cierto número de compuestos (resinas, grasas, clorofila, alcaloides, taninos) que podrían interferir con las reacciones que posteriormente se aplicarán. En ocasiones, es conveniente añadir al alcohol unos 5 ml de ácido tartárico (Errera) a fin de coagular los albuminoides.

Los principales reactivos son los siguientes:
- — *yoduro potásico yodado,* tinción amarilla no específica;
- — solución acuosa muy diluida de *eosina,* tinción rojiza no específica;
- — *reactivo de Millon,* tinción roja (que da también reacción positiva a algunas gomas y con ciertos compuestos aromáticos) específica pero débil.

Para preparar dicho reactivo, Lison recomienda seguir la fórmula de Bensley, dado que se aplica en frío y ofrece una tinción permanente.

Diluir 400 ml de ácido nítrico concentrado ($d = 1{,}42$) con un litro de agua destilada y dejar reposar unas cuarenta y ocho horas.

Diluir nuevamente unas diez veces por lo que nos queda un ácido nítrico del 4 %. Saturar este ácido diluido añadiendo un exceso de nitrato mercúrico; filtrar al cabo de varios días: a 400 ml de la solución mercúrica, añadir 3 ml de la dilución inicial de ácido nítrico al 40 % y 0,4 g de nitrito sódico; esta mezcla debe hacerse en el momento de usar.

Hacer actuar este reactivo sobre los cortes, en frío, durante varias horas (generalmente tres horas son suficientes). Los prótidos quedan teñidos de color rojo o rosa. La reacción se debe a los núcleos aromáticos, sobre todo los de tirosina, también se da con algunos compuestos fenólicos.

Reacción de la quinona, tinción pardo-rojiza, presentada por los prótidos calentados en contacto de la quinina en polvo.

Reacción xantoproteica, tinción amarilla, obtenida por la acción del ácido nítrico concentrado; esta tinción es más intensa cuando se añade amoníaco, es muy específica.

Ácido fosfomolíbdico, tinción amarilla, se obtiene tras aplicación de una o dos horas, no es específica.

Sulfato de níquel en solución concentrada en amoníaco, tinción amarilla o azul, éste pasa a anaranjado por la acción de la potasa (reacción de Guezda); el tanino se tiñe aproximadamente de la misma manera, pero el color no vira con la potasa.

Reacción del biuret, tratar los cortes con una solución bastante concentrada de sulfato de cobre; lavar en agua durante una hora y después tratar con potasa concentrada. La tinción obtenida varía del rojo al violáceo, según la naturaleza química de las proteínas.

Reacción del azul de Prusia de Zachari (1883) (específica): tratar previamente durante una hora en un mordiente, una solución de ferrocianuro potásico acidulado por el ácido acético, lavar y tratar con el percloruro de hierro. Se produce un precipitado de color azul de Prusia.

Reacciones tánicas: Overton (1890) emplea la acción sucesiva del ácido gallotánico y del ácido ósmico. Poulsen (1890) hace actuar el tanino durante una hora y después trata los cortes bien sea con el dicromato potásico, o con el sulfato férrico.

Bruère caracteriza los prótidos glutenogénicos del endospermo de las semillas de trigo con el bromo-cresol púrpura y con el bromo-cresol verde en solución al 0,1 g por 20 ml de etanol de 60°. La tinción obtenida oscila del azul al violeta y al verde. Los geles celulósicos y amiláceos así como los lípidos no quedan teñidos.

Localización de las deshidrogenasas. — El cloruro de 2-3-5-trifeniltetrazolium ha sido utilizado por R. Pratt y por J. Dufrénoy para localizar las deshidrogenasas en los tejidos vegetales. Esta sal, que da una solución acuosa incolora, es fácilmente absorbida por inmersión de los fragmentos vegetales en este líquido. En los centros de gran actividad reductora, precipita bajo forma del formazán, rojo insoluble, muy visible al aplicarlo sobre los cortes obtenidos a mano alzada. Esta tinción se manifiesta principalmente en la franja meristemática que corresponde al cambium y en el liber floemático, sobre todo a nivel de la criba. Se utiliza una solución al 0,5 al 1 %. Este reactivo ya había sido utilizado para comprobar la vitalidad de las semillas y de las levaduras o en las yemas de árboles y arbustos.

Aleurona. — Se tiñe de amarillo tras aplicarle el yoduro potásico yodado (agua: 100 ml + yodu-

reactivo de Millon. Da reacción positiva a las proteínas. Los granos de aleurona (nueces, avellanas, almendras) pertenecen al grupo de sustancias llamadas nitrófilas. Sobre los cortes de material fijado, los globoides aparecen como esferocristales.

Para teñir los granos de aleurona sobre cortes, Beauverie y Guilliermond aconsejan fijarlos con formol y teñirlos con el azul de toluidina, el azul policrómico de Unna o el Giemsa. La sustancia fundamental queda de color azul pálido, el cristaloide de color azul intenso, el globoide rojo (metacromasia).

G. Kühnholtz-Lordat trata los cortes durante dos o tres minutos con el Sudán III:

Agua destilada: 10 ml + alcohol de 95°: 10 ml + glicerina: 5 g + solución alcohólica de Sudán III hasta obtener una tonalidad granate.

Seguidamente se tritura *ligeramente* el corte sobre el portaobjeto, se descartan los grandes fragmentos y se recubre con el cubreobjetos.

Los globoides contienen un lípido que se tiñe bien con el ácido ósmico, la mezcla de Nadi, los Sudanes B negro y rojo, el escarlata, el Feulgen (sin hidrólisis).

J. Pavillard procede de manera todavía más simplificada. Coloca los delgados cortes del albumen de ricino bajo el aliento, recubre con un cubreobjetos y al microscopio puede observarse perfectamente bien la aparición de los cristaloides.

Glucósidos. — Molisch los caracteriza por la acción sucesiva del naftol o con el timol y del ácido sulfúrico concentrado, por ejemplo sobre la inulina. La reacción es bien visible y rápida (dos minutos) con la sacarosa, la lactosa, la maltosa, la dextrosa y la levulosa; es menos rápida (dura de quince a treinta minutos) con los hidratos de carbono que deben inicialmente ser transformados en azúcar bajo la acción del ácido sulfúrico. Esta reacción es muy sensible, permite poner de manifiesto azúcares en una concentración del orden de 0,00001 %.

Almidón. — Se tiñe de *azul* con el yodo (yoduro potásico yodado); cruz negra en luz polarizada. Para la búsqueda del almidón en el material desecado, tratar con ácido láctico tibio al que se le añade un poco de yodo (Lagerheim). Los tejidos vuelven a adquirir su volumen primitivo.

Glucógeno. — Los métodos descritos anteriormente, en el capítulo de histoquímica animal, no siempre permiten caracterizar el glucógeno en los tejidos vegetales. R. Reilhes ha efectuado una revisión crítica de estos procedimientos y menciona muy especialmente el empleo del ácido bromohídrico humeante diluido en un volumen doble de agua [illegible] de color rojo más o menos intenso y permite diferenciarlo del glucógeno que permanece incoloro. Esta reacción es más patente que la que se obtiene con las soluciones yodadas o con los reactivos de Best o de Bauer. Debe recordarse que el glucógeno en las plantas se halla únicamente en los hongos.

Inulina. — Deben mencionarse las propiedades ópticas de los esferocristales de inulina, obtenidos al hacer macerar en alcohol fragmentos algo gruesos de tubérculo de dalia. La inulina no se diferencia ópticamente de los esferocristales de fosfato cálcico más que por presentar una elevada birrefringencia, a la vez que estos últimos no totalmente solubles al ácido sulfúrico concentrado como lo es la inulina. También pueden caracterizarse químicamente estos esferocristales tratando los cortes, primero con α naftol o con una solución alcohólica de timol al 15 % y después con ácido sulfúrico concentrado (reacción de Molisch). Se obtiene una tinción violeta oscura con el α naftol y púrpura oscura con el timol. Pueden también tratarse los cortes en frío, con una solución alcohólica de orcina después en caliente con el ácido clorhídrico: tinción *rojo anaranjada* (reacción de Green).

H. Belval y G. Legrand han demostrado que en el aguaturma, la **inulina** se localiza alrededor de los vasos, los cuales se hallan rodeados de dos o tres capas de células poco visibles, pero que dan reacción positiva a la nadirreacción.

Celulosa. — Las reacciones de la celulosa son a veces bastante difíciles de obtener. Efectivamente, sólo se manifiestan de forma clara cuando esta sustancia se transforma bajo la influencia de los cloruros metálicos, de los ácidos minerales (ácido fosfórico yodado de Mangin) y sobre todo con los álcalis cáusticos.

Tras la acción del ácido sulfúrico el yodo da reacción *azul*.

Los cloruros de zinc, calcio y de aluminio yodados (Mangin) dan una tinción *violeta*; esta reacción clásica es en ocasiones difícil de obtener a causa de la lentitud con que actúa el cloruro metálico. El cloruro de zinc demasiado concentrado no da reacción. Cuando la celulosa está acompañada de lignina (o de otras sustancias) hay que *desenmascararla*. En este caso se recurre a la reacción de Schulze a base de diafanol-cloruro de zinc yodado.

Con respecto a los colorantes, la celulosa (transformada) es acidófila y toma preferentemente colorantes azoicos: rojo Congo (en solución en el amoníaco del 2 al 5 %); la benzopurpurina, la deltapurpurina, en solución alcalina, orseilina BB, orceína, cromotropo FB en ácido. La fenosafranina tiñe de color *rosa* o en amarillento los geles celulósicos del grano de trigo (Bruère). Soluble en el óxido de cobre amoniacal (reactivo de Schweitzer).

El cloruro de estaño yodado (Mangin) da una coloración *azul* que permite distinguir perfectamente la celulosa del almidón; este último se tiñe de color *violeta* con el mismo reactivo. Se prepara descomponiendo con muy poca agua el cloruro de estaño humeante: se añade un poco de solución acuosa de yodo y de cloruro potásico.

El hemalumbre tiñe más o menos todas las celulosas no lignificadas.

R. Reilhes ha llegado a conseguir una tinción permanente, a base de yodo, de las celulosas deshidratadas, del glucógeno y de los almidones. La solución tintorial consta de: etanol: 50 ml + yodo: 4 g + yoduro amónico: 1 g, para neutralizar el líquido. Los cortes deben ser deshidratados durante doce horas con alcohol absoluto. Antes de teñir debe dejarse evaporar el alcohol. Para teñir debe dejarse caer una gota sobre el corte previamente colocado sobre el portaobjetos y dejarla evaporar. Montar con la terebentina de Venecia natural (meleze): extender la resina sobre un cubreobjetos que se gira sobre el corte y se coloca sobre el portaobjetos. También puede calentarse suavemente a fin de que se extienda mejor. La mezcla de esta resina y de aceite secante es un buen medio. Este procedimiento también es adecuado para la extensión de microorganismos.

La *celulosa de los hongos* es muy distinta por estar generalmente mezclada con grandes cantidades de *quitina*, no da ninguna de las reacciones anteriores.

Para evidenciar la **quitina**, Brunswick trata los cortes de hongos superiores primero con la potasa, que transforma la quitina en *quitosana* y ácido acético, después, tras lavado para eliminar este último con el ácido nítrico, en caliente. Tras enfriamiento, el nitrato de quitosana aparece bajo forma de esferocristales que al microscopio de luz polarizada dan la cruz negra. Mediante la reacción de Schulze, desenmascaramiento con el diafanol y acción del cloruro de zinc yodado (v. p. 252).

Callosa. — Insoluble en el óxido de cobre amoniacal. Se tiñe con la coralina sódica en solución en el carbonato sódico al 30 %; debe diferenciarse seguidamente con el carbonato de sodio al 4 %; los azules de anilina solubles en agua (particularmente el azul de metilo, el azul Chicago muy azul, etc.). Los azules deben utilizarse al 1 % acidulado con un 3 % de ácido acético.

Tinción combinada de la celulosa y de la callosa: mezclar dos soluciones de azul de anilina y de orseilina BB acidulada al 3 % de ácido acético; la callosa será azul; la celulosa, rosa. Montar con glicerina gelatinada o con jarabe gomoso de Apathy.

Según E. Schmidt y colaboradores la pared de las células vegetales está formada por dos tipos de elementos. Por un lado, la sustancia esquelética fundamental, que puede ser la celulosa o la quitina, asociadas a hemicelulosas o a pentosanas. Por otro lado, hay una serie de sustancias incrustantes que enmascaran la celulosa o la quitina: son las hexosanas y pentosanas, unidas a otra sustancia atacable por el ácido perclórico, estas sustancias se disuelven en el diafanol sin teñirse.

P. Schulze ha demostrado que ocurre lo mismo con diversas sustancias esqueléticas de los animales.

P. Schulze y G. Kunike han establecido un cuadro de caracteres diferenciales de diversos elementos de paredes vegetales y cubiertas animales.

Caracterización de los elementos de las paredes vegetales y de las cubiertas animales. — Desincrustar la sustancia a estudiar con el ácido perclórico, después disolver con ácido sulfúrico concentrado. La solución sulfúrica, con una solución concentrada de α-naftol en el alcohol de 50°, da:

1) Tinción violeta 3
   sin coloración violeta 2
2) Tinción amarilla con los naftoles α y β, este último disuelto en alcohol al 15 % ..... *queratina*
   Tinción amarilla con el β-naftol, reacción negativa con el α-naftol ..... *escintilina*
3) Con el β-naftol: tinción violeta *Celulosa* y *Tunicina*
   tinción amarilla 4
4) Sustancia insoluble en frío en el ácido fórmico anhidro ..... *espongiolina*
   sustancia soluble 5
5) Tinción violeta con el cloroyoduro de zinc *quitina*
6) Disolver la sustancia en ácido nítrico concentrado y añadir un exceso de amoníaco.
   Tinción amarilla ..... *conquilina*
   Tinción pardo anaranjada ..... *corneína*

Paredes lignificadas. — Generalmente los colorantes directos de la lana y de la seda tiñen bien el leño, mientras que los colorantes directos del algodón tiñen las partes no lignificadas. Es conveniente fijar el color con un baño de alumbre al 10 %. Los mejores métodos para poner de manifiesto el leño son: safranina anilada (diferenciación con alcohol clorhídrico); carmín alumínico y verde yodo, verde de metilo o azul de metileno; verde brillante y deltapurpurina; verde luz diferenciado con agua; crisoidina y benzoazurina (Dop); también pueden teñirse los cortes durante quince minutos en una solución alcohólica concentrada de cianina o de crisoidina, lavar con etanol y después teñir durante quince minutos en una solución de rojo Congo al 5 % en amoníaco, deshidratar y montar. Las paredes lignificadas son azules o amarillas, las otras quedan de color rojo.

La pararrosanilina amoniacal proporciona igualmente una buena tinción del leño, del súber y de la cutina. Debe saturarse una solución alcohólica de pararrosanilina hasta que adquiera una coloración *amarillo paja*. Esta solución únicamente se conserva durante unos días. Teñir durante algunos minutos, lavar con agua destilada, después con agua acética y teñir nuevamente durante quince minutos con el azul de metileno. Montar con bálsamo. Debe señalarse finalmente que el *leño y el súber presentan reacción Gram positiva.*

Las reacciones típicas de la lignificación son las siguientes: tinción *púrpura intensa* por acción sucesiva de la floroglucina en solución alcohólica al 2 %, después con ácido clorhídrico al 50 %, tinción *amarilla* por el sulfato de anilina seguido de ácido sulfúrico; tinción en *verde* por el verde luz seguido de un lavado con agua (Bugnon). La solución acuosa de pararrosanilina da, después de una diferenciación con alcohol pícrico (una parte de solución alcohólica saturada por dos partes de agua), una tinción exclusiva del leño.

A. M. G. Rutten obtiene una tinción *anaranjada*, pasando a *rojo oscuro* cuando somete el material a la mezcla siguiente:

Clorhidrato de parafenileno diamina: 0,5 g + ácido paraamino-benceno-sulfónico 0,1 g + mezcla a partes iguales de agua, de alcohol de 70° y de glicerina: 30 ml.

G. Netien y M. Névoret obtienen una hermosa tinción amarillo-dorada con las sulfaminas (dagenan, tiazoamina, fontamina, septoplix) en el ácido clorhídrico al 50 %.

Reacción de Maule: tratar los cortes durante cinco minutos con el permanganato potásico al 1 %, lavar con agua y desteñir con ácido clorhídrico; lavar profundamente y después tratar con amoníaco: únicamente queda de color *rojo* la lignina.

Doble reacción de Morquer. — Permite caracterizar simultáneamente la lignina y la celulosa. Tratar inicialmente los cortes durante 10 min con hipoclorito sódico y después lavar; tratar 10 min con floroglucina al 2 % en alcohol; mezclar en un vidrio de reloj 1/20 de ml de

solución yodo-yodurada (agua destilada: 20 ml + yodo: 0,5 g + yoduro potásico: 1 g) y 1/5 de ml de ácido yodhídrico humeante; dejar actuar esta solución sobre los cortes durante un minuto; observar en glicerina acidulada con ácido yodhídrico. La lignina queda de color *rojo* y la celulosa *violeta*.

Paredes cutinizadas. — La solución alcohólica de Sudán III las tiñe de color rojo intenso, la cianina en azul. Las cutículas son acidorresistentes y se tiñen específicamente con el método de Ziehl-Neelsen.

Mordiente catiónico de M. T. Dyar *para teñir la pared celular de los microorganismos*.

Preparar un frotis fijado por calor; verter sobre el portaobjetos 3 gotas de una solución de cloruro de cetilpiridina M/100, es decir al 0,34 %; añadir 1 gota de solución acuosa saturada de rojo Congo; lavar con agua; teñir con el azul de metileno con toluidina; lavar con agua y observar montado en una gota de agua o en seco y con una gota de aceite de inmersión.

Vasos cribosos. — Belval y G. Legrand han demostrado que los vasos cribosos, así como las células adaptadas al transporte y quizás en la elaboración de sustancias de reserva se tiñen específicamente con el *reactivo de Nadi.*

Emplear preferentemente soluciones M/100 de los dos elementos del reactivo.

Leño. — Se tiñe de *rojo* con el Sudán III y con el alcaneno, en *azul* con la cianina en solución acuosa, en *pardo* con el yodo y el ácido sulfúrico. Es insoluble en el óxido de cobre amoniacal.

Se tiñe específicamente con el cristal violeta amoniacal o con el verde luz amoniacal: se prepara añadiendo poco a poco amoníaco en una solución alcohólica de estos colorantes hasta que haya una decoloración casi completa. Tras actuar algunos minutos se lava con ácido clorhídrico al 5 % para diferenciar nítidamente el color; lavando simplemente con agua, el leño queda intensamente teñido y contrasta perfectamente bien el resto de los tejidos.

Puede hacerse una doble tinción con el verde luz, añadiendo en el momento de usar amoníaco un poco de solución concentrada de rojo Congo. Se tiñe durante cinco minutos y después se lava con agua. El leño y el súber quedan de color *verde*, el resto *amarillo*.

Compuestos pécticos. — Se comportan como ácidos y se tiñen bien con los colorantes básicos (preferentemente en solución acidulada con un 0,05 % de ácido acético), pero no con los colorantes ácidos, a diferencia de la celulosa. El mejor reactivo para poner de manifiesto estas estructuras ricas en sustancias pécticas es el rojo de rutenio, conservándose muy bien la coloración al montar con bálsamo. El violeta neutro los tiñe de color rojo-pardusco. El azul de naftaleno los tiñe metacromáticamente. El azul de molibdeno (página 260) las tiñe de *azul*.

Reacciones diferenciales: la celulosa pura sólo se tiñe con el azul de metileno y las sustancias pécticas no quedan teñidas con el rojo Congo amoniacal.

Tinción combinada de la celulosa y de los componentes pécticos: eliminar el contenido citoplasmático con tratamiento a base de hipoclorito y después teñir con una solución acuosa de benzoazurina o de azurina brillante; lavar con agua; fijar la tinción con el sulfato de cobre al 1 %, lavar con agua, teñir con rojo de rutenio y montar con glicerina gelatinada o con jarabe gomoso de Apathy.

Gomas. — Hay dos tipos: las gomas pécticas que se tiñen como los mucílagos pécticos con el rojo de rutenio y las gomas celulósicas (goma de adraganto) que se tiñen a la vez con el rojo de rutenio y con los colorantes de la celulosa.

Cuando los cortes salen del alcohol son tratados por el subacetato de plomo que coagula la goma convirtiéndola en insoluble.

Se lava con agua, se tiñe con rojo de rutenio; deshidratar y montar.

Las gomas auténticas no se tiñen con la coralina sódica y toman color *rojo* intenso con la mezcla de floroglucina y ácido clorhídrico. Lutz distingue las gomas de celulosa con la acción sucesiva del rojo neutro y del verde ácido J3E de Poirrier: la goma queda de color *rojo*, la celulosa pura, de color *verde*.

Mucílagos. — Los *mucílagos celulósicos* (los menos frecuentes) presentan las mismas reacciones que la celulosa, son birrefringentes; los *mucílagos pécticos* (los más frecuentes, se hinchan y dan soluciones filamentosas) se tiñen con los colorantes básicos y por el rojo de rutenio (buena conservación en el bálsamo); los *mucílagos callósicos* se disuelven sin hincharse, se tiñen con la coralina sódica y con el azul de anilina en solución acética, pero no se tiñen con los colorantes básicos. No siempre se diferencian bien, dado que frecuentemente estos mucílagos y gomas se encuentran mezcladas.

H. Roques fija a la vez que tiñe de color amarillo los mucílagos con una solución acética de acetato de bencidina durante cuarenta y ocho horas. A continuación se obtienen cortes, que se montan con glicerina o con bálsamo. La tinción se conserva bien. Se obtiene un viraje de color azul tratando durante algunos minutos con la solución anteriormente mencionada; lavar con agua y virar con una mezcla, a partes iguales de formol al 30 % y de cloruro férrico. Lavar y montar con la glicerina; esta coloración no se conserva.

Lípidos. — El reactivo más adecuado y cómodo de manejo es el Sudán III en solución alcohólica, que se tiñen de color *rojo intenso* (este reactivo tiñe también: las ceras, las resinas, la cutina, la suberina y el látex, pero no tiñe ni la celulosa, ni la dignina, ni los mucílagos). El negro Sudán B ofrece resultados todavía mejores.

Método de Burdon al negro Sudán B. — La extensión, secada y fijada al calor, se tiñe sobre el portaobjetos (cubrir el portaobjetos con el colorante) con el Sudán B 3 % en alcohol de 70°. Teñir. Sacudir de vez en cuando el colorante y dejarlo seguidamente reposar durante doce horas. Se conserva varios meses en frascos bien cerrados. El tiempo de tinción óptimo es de diez a quince minutos (incluso no hay inconveniente de que la solución tintorial llegue a secarse sobre la extensión). Tirar el colorante, secar con papel de filtro y después lavar con xilol. Tinción de contraste durante cinco o diez segundos con safranina al 0,5 % en agua. Este método es para bacterias y hongos.

Esencias. — Emplear el método de Zweibaum y Mangenot, con el azul de indofenol recién preparado (mezcla Nadi, ver pág. 237) que tiñe las grasas y las esencias. Cortar con el micrótomo de mano o con el de

ALEX

congelación. Montar con jarabe gomoso de Apathy o con glicerina gelatinada. Estos cuerpos son muy difíciles de distinguir microquímicamente de los lípidos.

Aceites. — Los aceites grasos se tiñen de *rojo* con el Sudán: son insolubles en ácido acético y en parte son solubles en alcohol; los aceites etéreos se disuelven en el ácido acético y en el alcohol. Se tiñen de azul con la cianina en solución alcohólica al 1 %.

Resinas. — Se tiñen de *rojo* con el Sudán III y con la tintura de alcana.

Caroteno. — Se tiñen de azul con los ácidos sulfúrico y nítrico concentrados y con la mezcla de ácido clorhídrico y fenol. Soluble en sulfuro de carbono con un hermoso color *rojo sanguíneo.*

Pigmentos antociánicos. — Pigmentos con función fenólica, resultante de la reducción de las oxiflavonas. Presentan reacciones próximas a las de los taninos, pero son cristaloides y no coloidales y no precipitan con las soluciones alcaloides ni tampoco con la cafeína al 0,1 %.

Compuestos oxiflavónicos. — Con vapores de ClH cristalizan en forma de esferocristales (reacción de Klein). G. Hurel-Py también ha obtenido su cristalización por acción del agua destilada pura o añadiéndole acetona, glicerina o agua intensamente salina, pero al igual que la reacción de Klein los resultados de estas técnicas no son constantes. Son muy frecuentes en las plantas aunque frecuentemente se confunden con los taninos (los dos tipos de componentes se tiñen como los mucílagos).

Guilliermond y Gautheret confeccionaron una tabla de reacciones que permiten distinguir microcitoquímicamente estas dos categorías de compuestos. En el caso de las oxiflavonas la más característica es el amarillamiento con los álcalis, el precipitado *amarillo* (blanco para los taninos) provocado por el acetato de plomo y la ausencia de precipitación con los alcaloides.

Tanino y tanoides. — Los compuestos tánicos se tiñen de color *negro azulado* con el percloruro de hierro, de color pardusco por el dicromato potásico, en *rojo* por la potasa, en *azul oscuro* con el azul de metileno. Este último colorante da una reacción muy precisa, incluso sobre extensión (1/500 000) y sobre los tejidos frescos. El *reactivo de Braemer* (1 parte de tungstato sódico y 2 partes de acetato sódico por 10 partes de agua destilada) da, con los auténticos taninos, un precipitado *amarillo pálido*, insoluble en ácidos (salvo los ácidos cítrico y tartárico concentrados).

Según Guilliermond, los alcaloides y sobre todo la cafeína al 0,1 % son reactivos muy sensibles para los taninos, con los que dan un precipitado *blanco*, incluso en el caso de las soluciones muy diluidas que no precipitan con el dicromato potásico.

Como señala Verne, la tinción de los tanoides con los dicromatos alcalinos se parece mucho a la reacción cromafin dada por ciertos tipos de células animales: esta tinción, según Mangenot se debe a la presencia de compuestos fenólicos. Mangenot ha demostrado que ocurre lo mismo en el caso de la detección de la fucosana de las feofíceas.

El ácido gálico no se tiñe con el reactivo de Braemer pero toma una tonalidad *roja escarlata* con el reactivo de Spica y una tonalidad *rosa pálida* con el cianuro de potásico al 10 %.

Alcaloides. — Herrera ha diseñado un sistema para distinguir los alcaloides de los prótidos, aunque estos dos grupos de compuestos presentan las mismas reacciones generales. Hacer cortes bastante gruesos, que contengan al menos una capa de células y tratarlos durante unas veinticuatro horas con etanol tartárico al 5 %. Si se trata de alcaloides se hallan disueltos por el reactivo y los cortes ya no dan reacción positiva a los métodos que revelan los prótidos.

Materiales minerales. — El mejor método para ponerlos de manifiesto es destruyendo la materia orgánica, se opera sobre los cortes ya pegados al portaobjetos, bien sea por microincineración, bien sea aplicando oxidantes enérgicos, como el ácido perclórico. Sobre el portaobjetos queda un esqueleto mineral, generalmente formado por carbonato cálcico o por sílice. Si se quiere tener únicamente sílice debe tratarse el conjunto con ácido clorhídrico.

Oxalato cálcico. — Esta sal generalmente se presenta bajo la forma de rafidios o de drusas (masas erizadas de finos cristales); estos cristales son insolubles en agua y en ácido acético, bastante solubles en ácido clorhídrico, solubles en fosfato monosódico. El ácido sulfúrico los transforma (en caliente) en una masa de agujas de yeso (sulfato cálcico). Para distinguir el oxalato cálcico debe emplearse una solución de cloruro bárico en el ácido clorhídrico: este reactivo disuelve el oxalato y da con el sulfato un precipitado de sulfato de bario. Con luz polarizada los cristales de oxalato cálcico no siempre se hacen visibles cuando los nicoles están cruzados.

Para *teñir* las paredes incrustadas de sustancias minerales y particularmente el oxalato cálcico debe emplearse el verde de antraceno (método de Mangin). Disolver un cristal grande como una semilla de trigo de verde antraceno en 15 ml de amoníaco al 30 %. Preparar esta solución en el momento de utilizarla, teñir los materiales o los cortes durante algunos minutos, al salir del agua destilada; lavar con agua destilada y observarlo montado en este líquido.

Fósforo y fosfato cálcico. — Según Mac Callum y Lilienfeld, y siguiendo a Monti, deben tratarse los cortes con el molibdato amónico: 1 g-12 ml de ácido nítrico = 1,18 durante una hora o más; lavar con cuidado y sumergir los cortes en una solución de ácido pirogálico al 20 %. Las partes fosforadas quedan teñidas de un color que va del amarillo al negro. Las preparaciones así teñidas se conservan bien cuando se montan con una resina.

El molibdato amónico sólo da un precipitado *amarillo* característico con los fosfatos, pero no debe confundirse con la reacción xantoproteica debida al ácido nítrico del reactivo. El tartrato potásico impide la formación del precipitado.

Finalmente, mencionaremos una reacción muy sensible, se trata de la del fosfato amónico-magnésico. Tratar los cortes con una mezcla formada por: 25 vols. de solución acuosa concentrada de sulfato magnésico, 2 vols. de solución acuosa concentrada de cloruro amónico y 15 vols. de agua. Se obtienen cristales característicos en forma de X o de tapa de sarcófago.

Yodo y bromo. — Estos compuestos se encuentran en algas, sobre todo en las florídeas, en estado libre o combinado. Se encuentran en vacuolas especiales, los *yoducos* y los *bromucos* (Sauvageau). El mejor reactivo para la detección de los *yoducos* con yodo libre es el empleo del almidón que se tiñe instantáneamente cuando se rompen los yoducos y el yodo queda en libertad. Mangenot ha demostrado que el azul de cresil da un precipitado de color *verde* cuando se pone en contacto con el yodo libre, mientras que los yoduros originan unos ramilletes de cristales *rojos* o *violáceos*. Este colorante permite pues distinguir los yoducos con yodo libre de los yoducos con yodo combinado. En el caso de los bromucos Sauvageau ha utilizado una reacción muy sencilla que consiste en producir eosina al poner en contacto la fluoresceína con el bromo libre de los bromucos. La fluoresceína es pues el reactivo que detecta los bromucos. Sauvageau la utiliza en una solución al 0,05 % en agua destilada alcalinizada por 0,2 ml de amoníaco.

Resumen de las reacciones dadas por los principales colorantes:

Alcalina: súber, materias grasas, resinas.
Azul de metilo: callosa.
Azul de metileno puro: tanino; *alumínico:* leño y súber.
Carmín alumínico: paredes no lignificadas.
Rojo Congo: azulado con los ácidos; *rojo Congo amoniacal:* celulosa.
Coralina sólida: callosa (tinción efímera).
Cianina: leño, súber, paredes cutinizadas, oleoplastos, aceites etéreos.
Deltapurpurina (alcalinizado): paredes no lignificadas.
Pararrosanilina amoniacal: leño, súber, cutina.
Floroglucina y ácido clorhídrico: leño, gomas, inulina (tinción efímera).
Rojo de rutenio: compuestos pécticos.
Safranina: leño y súber.
Sudán III: tiñe específicamente: súber, cutina, grasas, resinas, aceites céreos; no tiñe ni los taninos, ni las paredes no suberificadas.
Verde yodo, verde de metilo: leño y súber.
Violeta neutro: compuestos pécticos, leño y súber.
Cristal violeta amoniacal: leño y súber.
Método de Gram: leño y súber.
Acidorresistencia: paredes cutinizadas.

TÉCNICAS MICO-FITO-PATOLÓGICAS

La finalidad de la técnica fito-patológica es la de poner de manifiesto los hongos parásitos en la superficie o en el interior de los tejidos vegetales.

La *búsqueda en superficie* no presenta ninguna dificultad; se procede de la siguiente manera: primero se rasca suavemente la superficie de la planta con un pequeño escalpelo, un vaccinostilo o con una agua lanceolada. Se disocia el material arrancado en una gota de lactofenol y se estudia entre el portaobjetos y cubreobjetos después de haberlo calentado suavemente, hasta la aparición de burbujas.

También pueden utilizarse *cortes transversales* y sobre todo *tangenciales* que inicialmente se observarán montados en lactofenol. Los cortes se habrán obtenido a mano alzada o con el micrótomo de Ranvier o con el modelo de Lelong, siendo este último mucho más práctico. El fragmento a cortar se sujeta entre los dos semicilindros de médula de saúco o de zanahoria o de hígado fijado, según se indica en la metodología clásica.

La utilización de técnicas tintoriales es evidentemente el mejor sistema para poner de manifiesto las hifas y micelios entre los tejidos vegetales.

Procedimientos de Ducomet. — *a)* TALOS FULIGINOSOS. — Estos talos tienen una pigmentación propia, basta con aclarar suficientemente el material para que adquiera una transparencia deseable a fin de ser observados al microscopio.

Cuando se trata de fragmentos vegetales y de cortes transversales, aclararlos sobre un portaobjetos en el que se deposita una gota de ácido láctico caliente o con lactofenol hirviendo, o incluso si se quiere un mayor transparentado en clorolactofenol simple o salicilatado.

Para los cortes tangenciales, emplear el ácido nítrico hirviendo sobre el portaobjetos (operar lejos del microscopio y de todo material metálico). Tras la decoloración lavar intensamente con agua y después pasarlos por ácido láctico hirviendo. En ambos casos deben montarse los cortes en una gota de ácido láctico.

Tinción con el rojo Congo. — Tratar el material con hipoclorito sódico durante varias horas, después *lavar* con agua destilada seguido de un lavado con agua ligeramente alcalinizada con sosa. *Teñir* con una solución acuosa concentrada de rojo Congo durante treinta minutos; lavar durante doce horas con agua alcalinizada y *montar* en glicerina gelatinada. Únicamente se tiñe de color rojo intenso el micelio. Si se observa en una gota de ácido láctico, el rojo Congo, que es un indicador, vira de color *azul.*

b) TALOS INCOLOROS. — Los dos mejores colorantes son el azul de metilo y la benzoazurina.

α. *Azul de metilo.* — Emplear este colorante en solución concentrada en ácido láctico a 20°. Después de la tinción, lavar y montar en ácido láctico. Puede sustituirse el azul láctico por el azul de lactofenol que hincha mucho menos las estructuras.

β. *Benzoazurina.* — Aconsejable sobre todo para los cortes tangenciales. Tratar primeramente estos cortes con *ácido nítrico* puro durante veinte minutos a una hora y media, según los casos; lavar con *agua,* después con *alcohol* para eliminar las burbujas de aire que se hayan podido formar. Tratar seguidamente los cortes con agua a la que se le han añadido algunas gotas de solución alcohólica saturada de *potasa* cáustica, dejarlo actuar durante el mismo tiempo en que se

han dejado los cortes en ácido nítrico; *lavar* de nuevo con agua alcohólica, después con agua acética y finalmente *teñir* con una solución concentrada y ácida de *benzoazurina* (solución de ácido acético al 3 %). La tinción debe durar de seis a doce horas, tras lo cual se diferencia en agua acética y posteriormente se calienta en el ácido láctico hasta que quede del todo transparente.

Una decoloración previa con alcohol permite reducir la duración del ácido nítrico y de la potasa.

Procedimientos de Mangin. — Inicialmente estos procedimientos se combinaban para el estudio de las peronosporales en sus huéspedes. Se basan en la riqueza en calosa que tiene la pared de estos hongos.

Los fragmentos de órganos parasitados, frescos o desecados, son liberados del aire que contienen expulsándolos por *ebullición en el alcohol*, blanqueados seguidamente durante seis a doce horas en el ácido clorhídrico al tercio, al que se le ha añadido un 5 % de clorato potásico. Seguidamente se conserva en el alcohol.

Tinción. — Bien sea en *baño ácido*: ácido acético al 3 % al que se le han añadido unas gotas de soluciones acuosas de *orseillina* BB y de *azul de anilina*, hasta obtener un líquido de color violeta. Tras la tinción debe sustituirse lentamente el colorante por la glicerina. El micelio adquiere una tonalidad *azul* destacando de las paredes celulares que quedan de color rosa.

Si se trabaja en *baño alcalino* se empleará una mezcla de *benzo-azurina* (o de *azurina brillante*) y de *rosazurina* en solución al 3 % en carbonato sódico al 20 %. Teñir durante dos o tres horas después lavar con agua y observar en una gota de glicerina preparada con una solución de sulfato de cobre al 2 % que fija los colores. En este caso el micelio queda de color *rosa*, las paredes celulares quedan de *azul.*

Otros procedimientos. — Kölpin Ravn *fija* el material en Flemming o simplemente utilizando el ácido crómico al 1 % con amoníaco.

Teñir, en un *primer tiempo,* durante quince a veinte horas en una solución concentrada de orseilina BB en el ácido acético al 3 %; lavar con agua y efectuar una *segunda tinción* durante una a dos horas en el *azul de metilo acético; lavar* y *diferenciar* en alcohol de 90°, después deshidratar y montar con bálsamo. Los filamentos micélicos quedan de color *azul oscuro,* las paredes celulares de color *azul celeste*, los núcleos y el citoplasma *rojos.*

B. T. Dickson emplea el *rojo de Magdala.* El material, conservado en el alcohol y teñido durante cinco a diez minutos con el rojo de Magdala al 2 % en alcohol de 85°.

Lavar con alcohol de 95°, después teñir durante uno a tres minutos con el *verde luz* al 2 % en esencia de girasol adicionado al 2 % de alcohol absoluto. Deshidratar y montar con bálsamo. Los elementos parasitarios quedan de color *rojo*, los tejidos del huésped *verdes.*

S. D. Garrett trata el material fresco (raíces) o saliendo del alcohol de 70° con sosa al 4 % al que se le ha añadido un 0,04 % de bromotimol azul (que es un indicador empleado para la determinación colorimétrica del pH).

Rojo de rutenio. — Este colorante es un sesquicloruro de rutenio amoniacal; se trata pues de una sal mineral y no un derivado de la anilina. Se presenta bajo forma de un polvo marrón-rojizo, soluble en agua y en la solución de alumbre potásico, pero no en el alcohol ni en la glicerina. Probablemente sus propiedades tintoriales se deban a los radicales NH. Dado que su precio es muy elevado el rojo de rutenio se vende por decigramos.

El rojo de rutenio es muy utilizado para estudios de anatomía vegetal, principalmente asociado con el azul de metileno alumínico y ha sido frecuentemente utilizado en técnica micológica, introducida por Mangin.

Dado que su solución acuosa no se conserva debe prepararse justo antes de usar colocando una pizca de polvo en algunos mililitros de agua destilada, en un vidrio de reloj, hasta obtener un líquido rojo oscuro.

La tinción que dura de cinco a diez minutos resiste en alcohol absoluto, por lo que es fácil deshidratar los cortes y montarlos en bálsamo. La tinción se destruye con los ácidos minerales.

El rojo de rutenio precipita en presencia de ácido pícrico. Su tinción es óptima tras la utilización de fijadores y mordientes crómicos. La adición de ácido acético al colorante permite obtener una tinción nuclear pura. Por otro lado, tiñe solamente las estructuras basófilas, así como las bacterias Gram negativas. Es por consiguiente el reactivo específico de los *compuestos pécticos.*

Deltapurpurina. — En histología vegetal se utiliza como un colorante específico de las paredes no lignificadas. Tratar previamente los cortes con hipoclorito sódico, siguiendo el método anteriormente descrito, seguidamente deben lavarse cuidadosamente los cortes con agua. Teñir con una solución acuosa al 1 % de deltapurpurina y observar en una gota del colorante. De esta manera, quedan teñidos los peronosporales, las *Entyloma*, la mayoría de las uredinales, las *Pseudopeziza*, las *Lophodermium* que también se ponen muy bien de manifiesto.

Técnica de las micorrizas. — Los hongos que forman las micorrizas pueden teñirse perfecta-

mente con la mayoría de los colorantes y métodos anteriormente descritos. A continuación, se describen otros dos métodos.

Noël Bernard hacía macerar el material en hidrato de cloral bastante denso y después teñía con azul de anilina que tiñe específicamente los hongos. Observar las raíces así tratadas, por transparencia, sin tener que obtener cortes. Este método da muy buenos resultados con las ofrideáceas así como con *Neottia nidus-avis*.

Galland tiñe los cortes con azul láctico, después lava con agua y con alcohol, trata con el tanino al 5 % para fijar el colorante, después deshidrata y monta en bálsamo.

Resumen de estas tinciones. — Únicamente con tres colorantes: azul de metilo al lactofenol, la deltapurpurina al 1 % y la rosazurina al 3 % empleados juiciosamente, pueden ponerse de manifiesto todos los hongos parásitos de las plantas.

TRATAMIENTO DE ROCAS PARA LA SEPARACIÓN DE ESPORAS, GRANOS DE POLEN Y MICROFÓSILES, CONSERVADOS EN ESTADO DE MATERIA ORGÁNICA

Se escogerá el método más adecuado siguiendo las indicaciones de la tabla adjunta:

1) Solubilización química de la roca
   a) rocas carbonatadas:
   calcáreas, yeso, tobas ..... atacar con ClH
   margas.... primero ClH y seguidamente FH

   b) rocas silíceas:

   arenas, limos, arcillas, esquistos. Tratar con FH

   c) rocas salinas:
   sal ..... agua
   anhídridos ..... fusión especial (difícil)

2) Destrucción de la materia orgánica no figurada.

   a) los residuos de los tratamientos anteriores deberán someterse sucesivamente a la acción de ..... KOH, Schultze, acetilación.

   b) sedimentos orgánicos:

   turba y lignitos recientes: KOH o NaOH + perborato o KOH + NaOH + SO_4Na_2
   lignitos antiguos: NO_3H, Schultze, acetilación, H_2O_2.
   carbones: Schultze, Zetsche, ácido clorhídrico, diafanol
   aceites, asfaltos: disolventes varios y aplicar seguidamente: KOH, Schultze, acetilación, cloración, KOH.

3) Materiales vegetales: acetilación, coloración, KOH.

4) Polvos y pólenes atmosféricos: acetilación, KOH.

PREPARACIÓN DE COLECCIONES PALINOLÓGICAS DE REFERENCIA
(tipo test)

Para agilizar el trabajo rutinario es muy conveniente hacerse o disponer de una colección de referencia de los principales tipos de pólenes, hechas con las mismas técnicas que se utilizarán posteriormente.

Recomendamos la estándar siguiente:

1) anteras frescas aplastadas (squash)
2) disolver los cuerpos grasos en éter
3) poner en suspensión el material resultante, en etanol caliente y filtrar
4) centrifugar
5) un tercio del residuo constituye la fracción A
6) los dos tercios restantes se acetolizan en baño maría a 80°, por nueve partes de anhídrido acético y una parte de ácido sulfúrico
7) centrifugar y poner en suspensión con ácido acético
8) separar el residuo en dos fracciones, B y C
9) B es centrifugado y lavado en agua destilada
10) a C se le añaden 0,5 ml de ClO_3Na y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado
11) C es centrifugado y lavado con agua
12) se reúnen B y C y se ponen a hervir en KOH al 10 %, se centrifuga y se lava con agua
13) se reúne el residuo en la fracción A
14) se lava con agua, si optativamente puede teñirse con la fucsina básica, con magenta o con el ácido periódico-reactivo de Schiff.

ESTUDIO DE MICROFÓSILES

La utilización del ácido periódico-reactivo de Schiff ha permitido a Boureau y Locquin (1980) no solamente demostrar la presencia en las rocas precámbricas de polisacáridos en cortes delgados, sino también, por desaminación oxidativa con la nihidrina, seguida de la actuación del reactivo de Schiff, evidenciar glucoproteínas y esclero-proteínas. Cuando los microfósiles están excesivamente aplastados por efectos de la fosilización, es posible provocarles un hinchamiento, previa extracción de la roca, sometiéndolos a la acción del acetato de amilo, en caliente (Locquin, 1981).

TÉCNICAS MICOLÓGICAS

La observación de los hongos epífitos es facilitada con el empleo de *colodion-lacto-ricino* de M. A. Gaillard (1891): nitrocelulosa: 4 g + etanol de 90°: 10 g + éter: 32 g + aceite de ricino 2 g + ácido láctico: 2 g. Una vez aplicada esta mezcla sobre los hongos, y tras dejarla secar, se arranca la película y se coloca sobre el portaobjetos; se disuelve el colodión con: etanol: 10 g + éter: 32 g. Se monta en un medio hidrófilo.

Otra manera de obtener réplicas de hongos es utilizando una cinta de plástico adhesiva tipo Scotch, recortada en pequeños rectángulos y teniendo la precaución de no dejar huellas de los dedos. Se aplica este adhesivo sobre la superficie del hongo a estudiar o sobre el soporte de los epífitos, se arranca la cinta adhesiva con lo que se mantiene la topografía general. El conjunto se sumerge en el fijador: etanol-acético durante 2 minutos, eventualmente puede hidrolizarse con ácido clorhídrico diluido durante 5-10 minutos, se lava rápidamente con agua y se deposita sobre el portaobjetos.

Muchas observaciones pueden hacerse directamente en una solución tintorial, sin previa fijación:

a) **Azul de metilo al lactofenol.** — El mejor colorante para estudios de micología general es sin duda el *azul de metilo*. Se trata de un azul de anilina ácido, derivado sulfonado del trifenilmetano. Las investigaciones de Guéguen han demostrado que este azul es el mejor de los azules de anilina para el estudio de los hongos. Los azules de anilina son colorantes específicos de la *colágena* en los animales y de la *callosa* en los vegetales. En los hongos tiñen la pared en el caso de que ésta sea de callosa o bien el contenido de las hifas.

El azul de metilo debe usarse en solución al 0,5 % en el lactofenol. Este *azul al lactofenol* es muy superior al azul láctico clásico, dado que el ácido láctico puro tiene la propiedad de hinchar demasiado las estructuras, este efecto es amortiguado por el lactofenol y los otros componentes. Si el poder de hinchar es insuficiente puede calentarse débilmente la solución.

b) **Azul de metilo-Sudán al lactofenol.** — Para poner de manifiesto los lípidos y otras sustancias sudanófilas se añade Sudán III al azul láctico, según la fórmula de Langeron:

Lactofenol saturado de Sudán III: 100 ml + azul de metilo: 0,5 gramos.

Para preparar la solución saturada de Sudán III debe hacerse hervir, en un matraz cónico, lactofenol conteniendo un exceso de Sudán III. Filtrar una vez la solución se ha enfriado.

c) **Reactivo yodado de Melzer.** — Este reactivo ha sido ideado para distinguir las paredes «amiloides», tiñéndose de color azul o negrusco, las paredes no amiloides permanecen incoloras en el reactivo de Melzer, las paredes «dextrinoides» toman tinciones marrones o pardo rojizas. Agua destilada: 100 ml + hidrato de cloral: 100 g + yoduro potásico: 5 g + yodo: 1,5 gramos.

d) **Solución yodo-yodurada o líquido de Lugol.** Excelente reactivo para el examen instantáneo y temporal de hongos filamentosos y sobre todo de *levaduras* y *elementos levuriformes*. Es poco refringente, aclara muy poco pero da imágenes de perfiles muy nítidos. Por otro lado, tiñe específicamente el glucógeno de un color *pardo caoba* que destaca con respecto a la tonalidad amarillenta adoptada por la pared y la parte del citoplasma exenta de glucógeno.

La fórmula a emplear es la del *doble Lugol*, con elevado contenido en yodo, aconsejado para el estudio de quistes amebianos por Knowles y Cole y por Dobell y O'Connor. Agua destilada: 100 ml + yoduro potásico: 2 g + yodo cristalizado: 1 gramo.

e) **Sudán III al lactofenol.** — Para la investigación y la tinción de los lípidos, puede utilizarse la solución saturada de Sudán III en el lactofenol, preparada como se ha descrito anteriormente, en el caso del azul de metilo-Sudán.

f) **Azul de metilo acético.** — Los colorantes mencionados hasta el momento ofrecen tinciones temporales, de materiales frescos o desecados o incluso de los conservados en alcohol.

El azul de metilo acético es una solución acuosa destinada a la tinción de cultivos celulares o sobre portaobjetos gelatinados y de cortes. La utilización de este colorante permite obtener fácilmente preparaciones permanentes que pueden montarse en una resina: agua destilada: 100 ml + azul de metilo: 0,5 g + ácido acético cristalizable: 3 ml.

Cuando se trata de un cultivo celular sobre portaobjetos gelatinado se procede ante todo a *desecarlo* completamente a la estufa a 37° y, protegido al máximo del polvo, a falta de una estufa, hacerlo a temperatura ambiente, en un desecador. *Fijar* con una gran gota de alcohol de 95° que se deja evaporar totalmente; *teñir* el cultivo desecado durante algunos minutos, con una gran gota de azul de metilo acético; lavar con agua; deshidratar y montar.

g) **Colorante biácido de Mann.** — El método de Mann, con el azul de metilo-eosina (1892), que da tantos éxitos en histología animal y en protozoología, se basa en la asociación de un azul sulfonado del trifenilmetano con otro colorante

ácido, la eosina, de ahí el nombre de Mann-biácido.

El azul ácido se utiliza habitualmente se denomina *azul de metilo*.

Agua destilada: 100 ml + azul de metilo al 1 % en agua destilada: 35 ml + eosina al 1 % en agua destilada: 45 ml.

Utilizar este colorante no como indica el método primitivo de Mann, sino el método simplificado de Dobell.

Teñir el cultivo bien desecado y fijado, o bien el corte desparafinado, durante doce horas, en frasco de Borrel, en el Mann-biácido; *lavar* rápidamente con agua corriente; *diferenciar* sobre el portaobjetos con una solución muy diluida de naranja G en alcohol de 70° hasta la obtención de una hermosa tinción rojo-violácea; *deshidratar* rápidamente con alcohol absoluto, sin pasar por alcohol de 90°, aclarar con tolueno y montar.

Este método sale fácilmente bien y da hermosas preparaciones con toda una gama de tonos que van del rojo vivo al azul oscuro. Esta tinción se conserva perfectamente bien con el bálsamo.

Tinción de núcleos. — Se tiñen los núcleos con la **orceína acética** con una concentración de ácido acético en proporción variable, atendiendo al tipo de hifas. La orceína acética se prepara disolviendo 2,5 g de orceína, en 100 ml de ácido acético hirviendo, diluidos seguidamente con 100 ml de agua; la solución resultante debe filtrarse varias veces, a intervalos de un día. La disolución final se hace con un 50 % de ácido acético; técnica de M. M. Laane (1968).

Puede sustituirse la orceína acética, que da muy buenos resultados, puede utilizarse el Giemsa (Kühner, 1949), el carmín acético (íd.), el carmín propiónico férrico y la orceína lactoacética.

El **carmín propiónico** de P. Singh (1968) se prepara disolviendo por ebullición de carmín al 0,5 % en 100 ml de ácido propiónico en solución acuosa al 40 %. Una vez enfriado se filtra y se añaden 5 gotas en solución saturada de cloruro férrico. Se fija como en el caso anterior con etanol-acético, los micelios o tejidos adheridos sobre el portaobjetos por una de las técnicas anteriormente descritas o con albúmina de Mayer; se hidroliza con una solución de cloruro sódico, 0,17 M, a temperatura ambiente, durante 20 minutos; se lava y seguidamente se somete a la acción de carbonato de litio al 2 % en solución acuosa, durante 4 horas. Se tiñe durante unos segundos, en caliente, se elimina el exceso de colorante y se cementa con vaselina, dejando la preparación de 12 a 24 horas al frío. Cuando se trata de obtener preparaciones permanentes se elimina el exceso de colorante con el ácido propiónico al tercio en el etanol, después en el alcohol butílico al 50 % en etanol, después en alcohol butílico puro, antes de montar en bálsamo.

La **orceína lactoacética** es la variante de la orceína acética que tiñe mejor los cromosomas. Se procede de la siguiente manera, siguiendo la metodología de T. S. Cooperrider y J. H. Morrison. El reactivo se prepara disolviendo: 1 g de orceína en 50 ml de ácido acético + 50 ml de ácido láctico al 65 % en solución acuosa. En ocasiones, los tejidos son previamente tratados con paradiclorobenceno durante 2 horas, en solución acuosa saturada, después de haber sido fijados en: metanol: 6 ml + cloroformo: 3 ml + ácido propiónico: 2 ml. Puede conservarse en la nevera. Se debe hidrolizar el material con ácido clorhídrico 1N durante 15 minutos a 60°; se tiñe en una gran gota del colorante, disociando por presión o agitación bajo el cubreobjetos.

Estas técnicas ponen en evidencia los gránulos siderófilos que son elementos utilizados en la sistemática de las agaricales leuco y rodosporales por R. Kühner.

Los hongos levuriformes pueden ser preparados según la técnicas de los frotis. Vanbreusegem (1947) extiende una colonia, la fija con el calor, tiñe en frío con la fucsina de Ziehl, diferencia con etanol láctico, tiñe con el azul de Nilo, después las recubre con una gota de tinta China para observarlas. Esta técnica también puede aplicarse sobre las disociaciones.

Tinción de los polipéptidos

La **paracresol-tirosinasa**, o reactivo de Chodat, tiñe los polipéptidos en *azul*, *rojo* o *rosa*, atendiendo su composición. La tirosinasa se obtiene a partir de los tejidos de la patata. La mezcla se prepara justo antes de usar, se mezcla un 50 % de solución acuosa de paracresol al 0,4 %-50 % de tirosinasa al 0,5 %. El hecho de que la tirosinasa exista en el citoplasma de muchas especies de hongos explica que varios fenoles hayan sido utilizados para obtener macrorreacciones características de algunos grupos. El reactivo de Chodat vira a color *azul-verdoso* en presencia del indol, que es un metabolito fúngico y bacteriano importante.

Los **reactivos sulfoaldehídicos** tiñen las sustancias fenólicas contenidas en algunos cístides e hifas.

Esta propiedad ha sido puesta de manifiesto por René Maire en sus trabajos clásicos de 1910 sobre las rúsulas y recientemente precisada por J. Boidin, H. Romagnesi ha sacado un gran partido a dicha técnica.

De todos estos reactivos, el más sensible para este género es el reactivo sulfobenzaldehído; presenta sin embargo el inconveniente de que a la larga los cortes de los tejidos o del himenio quedan prácticamente inobservables. Este inconve-

niente es en gran parte paliado con el reactivo sulfoanísico, que tiñe los tejidos no de color amarillento sino de color rojo púrpura, lo cual facilita el estudio histológico o estructural. Estos productos se conservan mal: 3 o 4 meses, deben ser preparados con reactivos muy frescos. El sulfopiperonal y la sulfovanilina presentan lá gran ventaja de poderse preparar extemporáneamente: un pequeño grano de piperonal y algunas pajuelas de vainilla, en el primer caso sumergido en el ácido sulfúrico concentrado y puro o disueltos en una solución agua ácida al 50 %, permiten obtener un producto siempre fresco, y altamente sensible. La sensibilidad del sulfopiperonal es muy superior a la del sulfovanilina; pero los cortes son casi indescifrables. La sulfovanilina, por el contrario, aunque mucho menos sensible que todos los otros productos mencionados, es mucho más ventajoso su uso dado el escaso contenido en ácido que posee y a su mayor poder de penetración. Permite hacer cualquier tipo de observación estructural e incluso medir los basidios y los cístides sin excesiva dificultad, aunque evidentemente, la nitidez de las imágenes es mucho mejor que cuando se observa en agua, el líquido de Melzer o el amoníaco.

Recientemente, J. Boidin ha recomendado preparar los reactivos sulfobenzaldehídico y anísico: verter sobre el portaobjetos una gota de estos productos, después de añadir una gota de ácido. Diversos ensayos nos han demostrado la excelencia de este método, que junto con H. Romagnesi recomendamos.

La acidorresistencia. — V. Melzer ha aplicado el método de tinción de Ziehl para el estudio de las incrustaciones perihíficas. Teñir 10 minutos con la pararrosanilina en solución acuosa al 1 %; lavar; sumergir 1 minuto en ClH acuoso al 2 %. Las estructuras acidorresistentes quedan de color *rojo púrpura*, según H. Romagnesi (cf. p. 234).

El azul de cresil amoniacoacético. — Utilizado por Locquin para poner de manifiesto en tres tiempos: la metacromasia, los lípidos, el hinchamiento de algunos estratos de las paredes. Teñir en una solución acuosa al 1 % de azul de cresil, observar; lavar con amoníaco al 50 %; observar los lípidos que se tiñen de color *amarillo dorado*; lavar con agua acética al 10 %, observar cómo se hinchan las paredes y se diferencian.

MICROSUBLIMACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS LIQUÉNICAS

Asahina y Shibata han desarrollado una serie de micrométodos muy sencillos y demostrativos para extraer e identificar los metabolitos de los líquenes. Utilizan un microincinerador de Bunsen. Las sustancias volátiles del talo se subliman a escasos milímetros de un cubreobjetos mantenido oblicuamente por encima del talo. Las sustancias se condensan sobre el vidrio frío y pueden identificarse directamente mediante cualquiera de las siguientes reacciones:

1) La sustancia es incolora y soluble en alcohol:
   a) Cl_3Fe: de rojo a violeta
   hidrolizable en
   pequeñas moléculas ..... *dépsidos*
   desecación por fusión alcalina
   Cl_2Ca azul ..... *dibenzofurano*
   Cl_2Ca incoloro..... *depsidones*

2) La sustancia es pigmentada:
   a) Naturalmente es amarilla o con un tratamiento en KOH al 10 %
   no fluorescente..... *ácido pulvínico*
   ácido uónico
   fluorescente..... *liquen-xantona*

   b) Naturalmente pigmentada de amarillo a naranja con KOH:
   púrpura-rojo ..... *hidroxiantraquinona*

   c) Naturalmente pigmentada en púrpura-negra insoluble en álcalis, soluble en la piridina, en disolución acuosa vira a índigo azul..... *fenatrenequinona*

DETECCIÓN CITOQUÍMICA DE LOS COMPONENTES DE LAS PAREDES

Locquin (1981) ha propuesto el siguiente cuadro de reacciones para conocer la naturaleza química de las paredes celulares de los hongos:

0) Teñir con Lugol fuerte y Cl_2Zn:
   marrón caoba 0
   azul 1
   violeta ..... *carotinoides*
   otras tonalidades o incolor 2

0') Teñir con BrH-H_2O_2:
   rojo intenso ..... *glucógeno*
   no da reacción ..... *xilogalactógeno*

1) Lavar con SO_4H_2:
   azul ..... *celulosa*
   ligeramente pardusco ..... *quitina*

1') Otra muestra deberá lavarse con SO_4H_2 concentrada:
   azul ..... *carotinoides*
   pardo rojizo ..... *cromolípidos*

2) Otra muestra deberá teñirse con el rojo de rutenio:
rojo ..... *mucílagos pécticos*
incoloro 3

3) Teñir con el sulfato sódico de alizarina:
rojo ..... *incrustaciones cálcicas*
incoloro 4

4) Teñir con azul de Nilo y lavar con H_2O_2:
azul ..... *cromolípidos*
incoloro ..... *melaninas y 5*

5) Sobre otra muestra aplicar la técnica de la acidorresistencia de Ziehl:
teñirlo ..... *ácido micólico, cromolípidos melaninas*
incoloro 6

6) Sobre otra muestra teñir con el azur de metileno:
azul ..... *esporopoleína*
rojo ..... *polisacáridos ácidos*

7) Sobre otra muestra aplicar el negro Sudán:
negro ..... *lípidos*
incoloro ..... *ausencia de lípidos*

8) Fijar y teñir un corte con O_sO_4:
negro ..... *esporopoleína, lípidos insaturados*
incolor ..... *otros*

9) Añadir ácido nítrico humeante sobre una muestra no tratada con anterioridad:
azul, verde o negro ..... *esporopoleína, carotinoides*
amarillo ..... *proteínas*
incoloro ..... *otros compuestos*

10) Sobre otra muestra aplicar un fijador crómico y poscromatizar:
amarillo a pardo ..... *escleroproteínas*
incoloro ..... *no hay puentes disulfuro*

11) Sobre otra muestra añadir sulfoformol:
azul negrusco ..... *fenoles y lignina*
rojo: ..... *fenoles y aldehídos*

12) Sobre otra muestra teñir con el parafenileno diamina:
azul negrusco ..... *fenoles*
incoloro 13

13) Decoloración con H_2O_2... *aldehídos, cetonas*

SOLUBILIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LAS PAREDES CELULARES

El agua caliente disuelve los *mucílagos*.

La sosa al 6 % a 20 °C solubiliza las *hemicelulosas*.

La sosa al 10 % a 17°, bajo presión, solubiliza la *quitina*.

El etanol caliente disuelve los *lípidos* y *las ceras*.

El hipoclorito a 5° disuelve la *celulosa*, a 12° la *quitina*.

El ácido sulfúrico a 50° o concentrado disuelve algunas *esporopoleínas*.

La glicerina, en caliente, disuelve la *callosa*.

El ácido tricloroacético a 10 % disuelve los *glucanos*.

El líquido cuproamoniacal disuelve la *celulosa* si previamente se ha blanqueado con lejía.

El anhídrido acético lo disuelve todo, salvo la esporopoleína.

El cloruro cálcico o el cloruro de estaño disuelve la *callosa*.

El dioxano disuelve los *polifenoles* y la *lignina*.

El ácido perclórico disuelve las *incrustaciones*.

Las enzimas específicas disuelven los correspondientes sustratos.

La juiciosa aplicación de estos disolventes *in situ* permite caracterizar estas sustancias cuando previamente se han eliminado las sustancias que pudieran enmascararlas o interferir con ellas.

IV. — MÉTODOS ESPECIALES UTILIZADOS EN PROTOZOOLOGÍA

TÉCNICAS PROTISTOLÓGICAS

Reglas generales para la observación microscópica. — En el estudio de los protozoos en estado fresco, juega un papel interesante. Cuando se trata de organismos tan delicados, los mejores detalles morfológicos se obtienen tras un examen directo del organismo vivo. Los métodos de fijación y de tinción únicamente son válidos para encontrar algunos detalles de la estructura citológica, poco visibles en estado fresco.

La observación tiene también un gran interés desde el punto de vista médico; en efecto, se trata del mejor método para el diagnóstico de las enfermedades protozoarias. Este tipo de examen no requiere el empleo de ningún tipo de reactivo

especial, ni pérdida de tiempo: siempre y cuando se disponga de un buen microscopio; puede hacerse extemporáneamente, incluso en el lecho del enfermo. Seguidamente, será completada por una tinción de los materiales recogidos después de esta primera observación. Pero por simple que parezca este método, requiere un adiestramiento del observador y un conocimiento completo del manejo del microscopio.

Por ello, la primera condición para el examen vital de los protozoos es la de disponer de excelentes objetivos, preferentemente apocromáticos y de conocer todos los recursos que pueda proporcionar el sistema de iluminación del instrumento. Cuando la observación se lleva a cabo de forma correcta es cuando se tiene la máxima información, más que cuando se ha fijado y teñido previamente el material, siendo a su vez el sistema idóneo para comprobar cualquier duda surgida tras la manipulación de los protozoos. Efectivamente, en ocasiones resulta altamente difícil diferenciar los artefactos de la preparación, sobre todo, los precipitados teñidos debidos a determinados fijadores, de los auténticos detalles estructurales. Si la estructura objeto de la duda se encuentra tanto en las preparaciones teñidas como en las preparaciones en fresco la duda queda resuelta.

La observación en campo oscuro es altamente interesante, máxime para el diagnóstico de treponemas. A consecuencia de los fenómenos de difracción, estos microorganismos parecen más voluminosos de lo que son realmente, lo cual, combinado con su aspecto brillante que adquieren sobre el fondo casi oscuro del campo óptico, permite localizarlos rápidamente y con facilidad. Como se ha indicado con anterioridad, este método sólo es ventajoso en el caso de ser manejado por manos expertas, a fin de llevar a cabo un estudio detallado de la estructura de los microorganismos.

Para todo lo que concierna a la *observación en vivo*, remitimos al lector al capítulo dedicado a este método general. Así como para el caso de las *tinciones vitales*.

De forma general, puede decirse que los *protozoos intestinales* en sus *formas libres* se hallan en las heces líquidas conteniendo sangre y mucus. Por el contrario, las formas enquistadas se encuentran en las heces más sólidas; son estas heces las que se prestan mejor a la observación microscópica.

Protozoómetros de Cropper. — Cropper propuso para la enumeración de elementos voluminosos, como los quistes de los protozoos, dos modelos de cámaras de recuento a gran escala o protozoómetros.

Una de ellas es fácil de construírsela uno mismo, se trata de un portaobjetos sobre el que se ha grabado con un diamante una serie de trazos paralelos, distantes medio milímetro. Sobre la zona así rayada se pega una celdilla de vidrio o de parafina, que pueda contener unos 20 ml de una emulsión.

El otro protozoómetro únicamente puede ser construido por un óptico. Sobre la base de una cámara húmeda de Ranvier, de 1/10 mm de profundidad, un cuadrado que corresponde a 25 mm^3 es cubierto de rayas cruzadas y espaciadas 200 μ. Deben haber 625 cuadrados, cada uno de 1/25 de mm^2.

AMEBAS

Cultivo de amebas

Amebas no patógenas. — **Amebas acuáticas.** — Es relativamente fácil conseguir amebas corrientes, sobre todo en primavera y verano.

Debe examinarse lo siguiente: las masas de oscilatorias (algas de un color azul-verdoso oscuro, que viven en el fondo del agua o aflorando en masas en su superficie); la capa gelatinosa que se encuentra debajo de las hojas de nenúfares; el lodo mezclado de restos vegetales que se encuentra en el fondo de agujeros. Por otro lado, el musgo que recubre las húmedas rocas, los esfagnus que se encuentran en algunas charcas, son muy ricos en rizópodos y particularmente en amebas. Basta con exprimirlas cual si fuesen una esponja y recoger el líquido que se escurre. Se conserva este agua en cristalizadores grandes que se han colocado en un sitio cálido: las amebas viven en su superficie y pueden fácilmente separarse del resto del líquido. Schaudinn y Eyferth aconsejan tirar algunos cubres en el agua que se supone que contiene amebas, éstas se adherirán al mismo y, al cabo de unas horas, se sacarán los cubreobjetos recubiertos de amebas.

Amebas de la paja. — Von Wasielewski y Hirschfeld, y más tarde Wülker, han estudiado gran número de especies de amebas. Uno de los sistemas adoptados por ellos a fin de conseguir protozoos, consistía en poner 20 g de paja triturada en un gran vaso cilíndrico de vidrio y regarla con un litro de agua corriente, prèviamente hervida y enfriada. En el momento que se forma una película en la superficie del recipiente, se extrae una pequeña porción y se extiende o siembra sobre una gelosa especial. Se procede de la misma manera con la tierra, el lodo, etc.

Amebas comensales. — Pueden obtenerse fácilmente amebas examinando el sarro y la caries dental del hombre, o el contenido rectal de diversos animales de sangre fría; es particularmente recomendable el contenido rectal de las ranas.

Amebas patógenas. — La búsqueda de amebas en las heces generalmente no presenta ninguna dificultad. Cuando el enfermo tiene una disentería bien típica, basta con extraer mediante un asa de platino una pequeña cantidad de mucosidad

sanguinolenta y observarla entre porta y cubreobjeto, sin diluir con ningún otro líquido, dado que incluso la solución fisiológica puede ser fatal para las amebas. Se reconocen fácilmente estos organismos por sus típicos movimientos, por sus vacuolas y por los glóbulos rojos que en muchas ocasiones albergan en su interior.

A fin de obtener óptimos resultados deben mantenerse las amebas vivas durante todo el proceso de observación. Para lo cual debe hacerse defecar al enfermo, justo en el momento que se piensa hacer la observación microscópica y recoger los materiales, *evitando que se mezclen con la orina*, en un vaso de precipitados o vasija perfectamente *limpia y seca*. La orina y los antisépticos matan enseguida los protozoos, el agua puede incorporar otros organismos a la muestra y ser por consiguiente fuente de errores en el momento de hacer las interpretaciones. La observación se llevará a cabo a una temperatura lo más cercana posible a los 37°, por medio de la estufa incorporada al microscopio de Foot. Según Simitch materiales emitidos desde 8 a 10 horas todavía permiten emitir el diagnóstico, a condición de que se hayan diluido en dos veces su volumen de líquido de Ringer e incluso sin necesidad de colocarlos a la estufa.

Si se constata la presencia de corpúsculos móviles debe:

1.° Asegurarse de que se trata realmente de amebas

2.° Observar si se trata de: *a)* amebas disentéricas; *b)* amebas inofensivas del grupo *coli* o *dispar*; *c)* amebas saprofíticas del grupo *limax*.

Un buen carácter a tener en cuenta para distinguir las amebas patógenas es el hecho de que presentan un endoplasma bien diferenciado del ectoplasma, muy vacuolar y conteniendo numerosos hematíes. Pero no deben confundirse las amebas con los macrófagos, o con los infusorios.

Tinción vital. — M. J. Hogue emplea el rojo neutro al 1/40 000 o al 1/60 000 (debe tenerse en cuenta que ya es tóxico a la concentración del 1/10 000) que permite visualizar gránulos; el azul de cresil brillante 2B en solución muy diluida que pone de manifiesto los gránulos y el cariosoma; el azul de metileno para visualizar el núcleo y para las mitocondrias emplear en negro Janus núm. 2 en solución muy diluida o el verde Janus igualmente diluido.

Acton y, posteriormente, J. G. Thomson y A. Robertson han demostrado el interés de la observación de los *cristales de Charcot-Leyden* para efectuar el diagnóstico de la disentería amebiana, sobre todo la crónica.

Quistes de amebas. — La búsqueda de los quistes de amebas en las heces se hará en estado fresco y dicha observación podrá ser completada con el estudio de las extensiones fijadas y teñidas. Para hallar quistes no es indispensable que las heces sean todavía calientes, como era el caso de querer encontrar formas vegetativas; pueden buscarse en heces evacuadas hace ya varias horas e incluso varios días. No debe olvidarse la existencia de *períodos negativos*, de una duración media de ocho días, según Deschiens.

a) **Observación vital.** — Se separan pequeños fragmentos de materia fecal y se observa entre porta y cubreobjetos. Si los materiales son excesivamente compactados debe hacerse una dilución con la solución fisiológica.

El grosor normal de una preparación es el que permite distinguir por transparencia letras de imprentas (Boeck). Debe ponerse previamente una gota de suero fisiológico e introducir a continuación el fragmento de material extraído de las heces; emulsionarlo cuidadosamente, a fin que no queden burbujas. Puede diluirse y tamizar la masa total de materia fecal, como describiremos más adelante, e incluso trabajar con el material concentrado por el método de Telemann modificado o bien siguiendo cualquiera de las técnicas utilizadas en coprología por concentración. Mucho se ha escrito sobre cada uno de estos métodos, cada uno de los cuales ha tenido sus partidarios y han encontrado ardientes defensores, sobre todo entre sus inventores. Considero que la opinión más inteligente es la emitida por Carter y Matthews. Es evidente que si por un lado se desea establecer categóricamente y de forma absoluta, la presencia o ausencia de quistes y que por otra hay que dar un diagnóstico tras una única observación, el método de concentración es el que da más garantías de aproximarse a la realidad. Ahora bien, para trabajos rutinarios, y cuando hay que efectuar numerosos exámenes, el tiempo que se pierde con estas manipulaciones no compensa los resultados hallados. Una observación entre porta y cubreobjetos es totalmente válida para la observación de quistes, evidentemente, siempre que existan.

Puede utilizarse en sistema de concentración de Yorke-Adams o el de Bidegaray. Los quistes de amebas resisten muy bien este tratamiento y el diagnóstico es sumamente fácil. Los quistes son perfectamente visibles con un objetivo de gran aumento, en seco, un poder amplificante de 400-500 aumentos es suficiente; sin embargo, cuando se tiene una cierta práctica ya se distinguen a 200 aumentos. Para un diagnóstico diferencial y para el estudio de núcleos debe utilizarse el objetivo de inmersión y diafragmar.

b) **Tinción de los quistes.** — Se han propuesto numerosos métodos para la tinción extemporánea de los quistes de protozoos: la mayoría de ellos utilizan la eosina y el yodo, asociados o por

separado. La experiencia ha demostrado que todos estos métodos pueden ser ventajosamente sustituidos por una tinción con Lugol que se lleva a cabo de manera muy sencilla y práctica, siendo suficiente en todos los casos. Esta es la opinión de la mayoría de los protozoólogos: Dobell y O'Connor, Lavier, Wenyon, etc.

TINCIÓN CON LA EOSINA. — Este método muy sencillo se debe a Kuenen y Swellengrebel (1913), habiendo sido también utilizado por Wenyon y O'Connor y vivamente recomendado por Brug (1936). Se mezclan cuidadosamente los materiales a observar con una solución acuosa de eosina al 2 %. La preparación debe ser delgada y desprovista de grumos. Los protozoos intestinales vivos, así como sus quistes vivos no se tiñen: se localizan fácilmente con unos 100 aumentos. La determinación debe hacerse a mayores aumentos y si es necesario tras una tinción con Lugol.

TINCIÓN CON EL YODO. — Este procedimiento, que es el más sencillo, el más rápido y el mejor, consiste en diluir un fragmento del material a estudiar en el líquido de Lugol. La visibilidad de los quistes es considerablemente aumentada tras la fijación-tinción con yodo. Dado que este reactivo tiñe específicamente el glucógeno de color pardo-caoba, los *quistes yodófilos* resaltan extraordinariamente. Este método da óptimos resultados con las heces frescas, no tan bueno con los materiales conservados en formol.

O bien se empleará la solución de Lugol (fórmula de Nicolle) que se emplea en la técnica del Gram, o más bien el *Lugol doble* aconsejado por Knowles y Cole, así como por Dobell y O'Connor (1 g de yodo y 2 g de yoduro potásico por 100 ml de agua destilada). Debe mezclarse cuidadosamente las heces con el reactivo para evitar la aglutinación de desperdicios fecales alrededor de los elementos parasitarios, debido a la acción coagulante del yodo.

Bidegaray ha mejorado felizmente la tinción del yodo mezclando extemporáneamente, sobre el portaobjetos, una gota de tionina fenicada y una gota de Lugol doble con una gota de las heces. La tionina actúa como un colorante nuclear y pone en evidencia la cromatina de los protozoos.

c) **Enumeración de los quistes.** — Emplear el método de Stoll o hacer una emulsión con otra titulación y enumerar con una cámara (Nageotte o Vernes) o con el protozoómetro de Cropper.

d) **Medición de los quistes.** — Esta operación puede hacerse en la observación vital, en el Lugol, o bien sobre preparaciones fijadas, teñidas y montadas en bálsamo. En este último caso, según Dobell y Jepps debería multiplicarse los resultados por 9/10 debido a la concentración producida por el xilol y por el bálsamo.

e) **Tinción de las extensiones.** — Las extensiones serán fijadas húmedas con el Bouin o con el sublimado alcohólico y teñidas con la hematoxilina férrica como se señalará posteriormente. Los carmines alcohólicos en ocasiones tiñen muy bien los quistes (Dobell). Para la observación del glucógeno de los quistes yodófilos deberá emplearse el carmín de Best que puede ser precedido por una tinción nuclear, por ejemplo con hematoxilina férrica de Weigert, la cual no altera en absoluto el glucógeno.

f) **Interés del estudio de los quistes.** — Es sumamente interesante, tanto para descubrir los ejemplares o individuos portadores de quistes, como para apreciar la contaminación más o menos indirecta de las aguas o los alimentos por materias fecales.

Fijación y tinción

Las mejores preparaciones de amebas son las que se obtienen fijando extensiones húmedas y tiñéndolas seguidamente con la hematoxilina férrica, el Romanovsky o el método de Mann al azul de metilo-eosina.

Fijación. — Se extiende pues una delgadísima capa sobre un portaobjetos, con la ayuda de un cubreobjetos, de una aguja o con el extremo de una pipeta, del medio rico en amebas. Esta extensión se llevará a cabo deslizando el material según el método descrito para la obtención de extensiones de sangre. La posición de las manos será la misma (p. 139).

Cuando las mucosidades son espesas, indudablemente debe hacerse un giro especial con la mano. Hay que arrastrar el cubreobjetos dejándolo apoyar por su propio peso y proceder a efectuar pequeñas sacudidas. De esta manera, se consigue extender mucosidades sumamente viscosas, sin aplastar las amebas ni tampoco los leucocitos. Antes de que la extensión se haya secado debe sumergirse rápidamente en el fijador contenido en una caja de Petri, colocándolo cara al fijador y apoyándolo sobre unas varillas de vidrio situadas en el fondo de la caja o cápsula de Petri y que evitan que las amebas toquen el fondo del recipiente.

En lugar de portaobjetos pueden utilizarse cubreobjetos que son de manejo más cómodo y exigen mucha menos cantidad de reactivos para sus manipulaciones. Para la fijación, se hacen flotar sobre el líquido fijador los cubreobjetos con la extensión.

Los líquidos de Duboscq-Brasil (preferible para los quistes) y de Bouin dan excelentes resultados y únicamente precisan manipulaciones muy sencillas. El sublimado alcohólico de Schaudinn,

acidificado por un 4 a 5 % de ácido acético cristalizable, sería posiblemente mejor para la fijación de los quistes, según Dobell. W. H. Wenrich y G. M. Geiman recomiendan, para los protozoos en general, el Schaudinn, diluido a la mitad con agua y en el momento de usar acidificado con un 2 % de ácido acético.

Nöller aconseja vivamente el empleo de fijadores a base de sublimado para las extensiones húmedas de protozoos. Señala como defectos de las soluciones pícricas el hecho de que no coagula suficientemente los prótidos y por consiguiente no garantiza la adherencia de las extensiones al vidrio. Por otro lado, estos líquidos no fijarían tan bien como el sublimado y disolverían o decolorarían diversas granulaciones. Finalmente, hay que señalar que su acción hemolítica impediría la conservación de los eritrocitos.

E. S. Goodrich ha obtenido óptimos resultados para los leucocitos y los protozoos asociando al fijador propiamente dicho, como por ejemplo al Bouin, el *líquido de Lugol*. Debe empezarse por aplicar el yodo y terminar con el Bouin o, todavía mejor, en el momento de usar, mezclar diez partes de Bouin con una parte de Lugol. Fijar en húmedo y continuar como en el caso de los otros fijadores.

Cuando se trata de *cultivos* de amebas y de protozoos intestinales en general, Simitch recomienda mezclar sobre el portaobjetos una gota de cultivo y una gota de clara de huevo. Se moja otro portaobjetos con un poco de clara de huevo y se extiende con precaución entre los dos portaobjetos que se separan a continuación. Sumergir rápidamente en el fijador.

Para obtener preparaciones de amebas de cultivo, deben fijarse en su propio medio. C. Dobell corta por la mitad cubreobjetos cuadrados y los conserva en agua destilada, en tubos estériles. Cuando se van a usar, se sacan estérilmente con un hilo curvado y sujetándolo con una pinza incandescente, se introduce en tubos de cultivo y se dejan descansar en el fondo. Se deja en la estufa durante un cierto tiempo, el cubreobjetos queda prácticamente horizontal. Se vuelve a sacar con un asa curvada, estéril, y se tira en el fijador, con la cara superior hacia abajo; al cabo de cinco a diez minutos se gira la cara del cubreobjetos, con los que las bacterias quedan libres.

Tras la fijación y el lavado se pueden almacenar en alcohol de 70° considerables cantidades de porta y cubreobjetos cargados de amebas. Lo primordial es que el material esté *siempre en un medio líquido y que no se seque jamás;* de lo contrario, las amebas se deformarían y serían irreconocibles.

Tinción. — Para el trabajo rutinario, basta teñir los quistes con el hemalumbre, pero para los estudios citológicos deberá seguirse algunos de los métodos siguientes:

1.° **Hematoxilina férrica.** — Debe procederse de la forma que se ha indicado detalladamente en el capítulo de metodología general de la tinción. Diferenciar hasta que el citoplasma quede perfectamente claro y el núcleo destaque de color *negro* intenso la cromatina. Los hematíes fagocitados, que son sideróphilos, quedan teñidos de color *negro* o *parduscos*.

El *método del alcohol* de Dobell ha sido especialmente diseñado para la tinción de las amebas.

Shortt aconseja, para teñir los citoplasmas y el fondo, emplear el colorante (verde luz, eosina, etcétera) disuelto en xilol fenicado de Weigert. Seguidamente se procede a lavar con dos baños de xilol dado que debe montarse con bálsamo.

2.° **Hematoxilina fosfotúngstica.** — La tinción de las amebas con este excelente reactivo es vivamente recomendado por R. Sohier y Ch. Jaulmes.

Para la tinción, Dobell aconseja dos métodos, a base de hematoxilina:

1.° HEMATOXILINA FOSFOTÚNGSTICA. — Hacer actuar como *mordiente* de treinta minutos a varias horas el ácido fosfotúngstico al 2 %, seguido de un lavado cuidadoso con agua destilada; *teñir* con la hematoxilina al 0,2 % en agua, durante quince a treinta minutos; *virar*, después de haber lavado con agua destilada, después con agua corriente hasta que adquiera una tonalidad rojiza (30 min); deshidratar y montar.

2.° HEMATOXILINA CON MOLIBDATO AMÓNICO. — Hacer actuar como *mordiente* el molibdato amónico al 2 % y teñir seguidamente.

Tompkins y Miller se limitan a diferenciar con la solución de ácido fosfotúngstico al 2 % después de haber aplicado el alumbre férrico como mordiente y efectuada la tinción con la hematoxilina.

3.° **Romanovsky.** — Las extensiones, fijadas húmedas con los líquidos pícricos, deben ser sumergidos en alcohol de 70° hasta que desaparezca totalmente el color amarillo y después lavar profundamente con agua. Emplear la técnica recomendada para los frotis húmedos.

James ha obtenido óptimos resultados con extensiones desecadas teñidas con el panóptico. Sobreteñir durante doce horas y diferenciar con el ácido bórico o con el fosfato monosódico.

4.° **Método de Mann.** — Seguir la técnica de Dobell. Los hematíes fagocitados por las amebas se ponen fácilmente de manifiesto (cf. p. 245).

5.° **Impregnaciones argénticas.** — Los autores españoles han aplicado las técnicas de impregnación argéntica para la localización de las amebas en los cortes. Ramírez Corria emplea el tanino argéntico (método de Río Hortega) o bien el car-

bonato de plata amoniacal (ver p. 249) para los detalles de estos métodos.

Quistes. — Según Dobell, el mejor fijador es el sublimado alcohólico. Como método de tinción, aconseja el carmín borácico de Grenacher, ligeramente acidificado con el ácido acético y el hemalumbre (fórmula de Mayer).

Métodos rápidos. — Estos métodos están destinados a permitir el empleo más fácil de la hematoxilina férrica, de manera que actúe con mayor rapidez y simplificando las manipulaciones. Las extensiones serán siempre fijadas en húmedo y *no deberán secarse* hasta que se haya hecho el montaje.

Método de Markey, Cubertson y Giordano (1943). — Esta técnica se caracteriza por el empleo del calor (56°) como agente mordiente y la tinción se hace con hematoxilina acética. La técnica dura globalmente unos diez minutos.

Fijar con el sublimado alcohólico de Schaudin, acidificado con un 10 % de ácido acético cristalizado, durante unos diez minutos, como mínimo; eliminar el fijador con el alcohol de 95° (eventualmente con el alcohol yodado); lavar con agua destilada; emplear como mordiente el alumbre férrico al 5 %, a + 56°; bastan dos o tres minutos; lavar con agua destilada; *teñir* con hematoxilina, a + 56° durante uno a dos minutos.

Hematoxilina cristalizada al 10 % en alcohol: 0,4 ml + ácido acético cristalizado: 0,8 ml + agua destilada. 40 ml. Hacer *virar* a azul con el agua corriente, durante diez a quince minutos; *deshidratar* con alcohol de 95° y absoluto. Pasar por tolueno y montar en bálsamo.

Método de L. S. Diamond al tergitol (1945). — Este procedimiento se hace en frío, a la solución de hematoxilina se le añade *tergitol 7* o cualquier otro agente del mismo tipo.

Fijar con el sublimado alcohólico de Schaudinn acidificado con un 5 % de ácido acético cristalizado, durante 2 minutos; *eliminar* el sublimado con el alcohol de 50° durante un minuto (eventualmente puede usarse el alcohol yodado); lavar con agua destilada, utilizar el alumbre férrico al 4 %, durante cinco minutos (actúa como *mordiente*); lavar con agua destilada; *teñir* cinco minutos con hematoxilina al tergitol. Solución de hematoxilina cristalizada del 3 al 5 % en alcohol de 95°: diluir al 1 % con agua destilada alcalinizada con un poco de bicarbonato sódico y a unos 30 o 40 centímetros cúbicos de esta dilución deben añadirse una gota de tergitol 7. Este colorante únicamente puede guardarse un día. Lavar con agua destilada; *diferenciación*, durante tres a cinco minutos con una solución acuosa saturada de ácido pícrico; hacer dos lavados con agua destilada; virar a azul con agua que contenga acetato potásico hasta que tenga un pH > 7; deshidratar por la serie de alcoholes, tolueno y montar en bálsamo.

Fijación en bloque y cortes. — Pueden dejarse caer en el fijador unas gotas de mucus o de pus, ricos en amebas. Estas gotas no deben ser demasiado grandes, a fin de que el fijador penetre rápidamente. Se incluye en parafina, se obtienen los cortes y se procede a la tinción, siguiendo las técnicas anteriormente mencionadas.

El formol al 5 % conserva admirablemente las amebas y sus quistes, los cuales conservan perfectamente el aspecto que tenían en vivo. Este procedimiento es particularmente aconsejable cuando se trata de obtener *material destinado a la enseñanza:* se eluyen los materiales o el mucus con su mismo volumen de una solución formolada, posteriormente se decanta el exceso de líquido. Si se trata de materiales normales que contienen quistes, es conveniente eluirlos y tamizarlos como se ha indicado anteriormente, de manera que queden eliminados los grandes fragmentos. Las preparaciones, montadas así entre porta y cubreobjetos se conservan bien después de haber sido cementadas con laca a la lanolina. A fin de evitar posibles desecaciones es preferible añadir al líquido formolado un 10 % de glicerina.

El estudio de las lesiones se hace siguiendo los mismos métodos. Los fragmentos de recto son extraídos a nivel de las ulceraciones, sujetados sobre planchas de corcho parafinadas y fijados siguiendo los métodos habituales. El Duboscq-Brasil y el Bouin dan óptimos resultados; seguidamente se tiñe con hemalumbre-eosina, con hematoxilina férrica, con el Romanovsky (método aplicable a los cortes) o con el Mann modificado por Dobell. Dobell empleó con gran éxito el tricrómico de Cajal, tal como se ha descrito anteriormente, sustituyendo la rosanilina por la rosanilina ácido trisulfonada (tinción específica de las amebas disentéricas) o con la safranina.

ESPOROZOOS

A. — *HEMOSPORIDIOS*

Los métodos que vamos a describir se aplican a los plasmodios, piroplasmas, teilerias, anaplasmas y rikettsias.

Observación vital

Esta observación es indispensable para poder estudiar los movimientos de los hemosporidios y los fenómenos que acompañan su fecundación. Para observar, en vivo, la emisión de flagelos de *Leucocytozoon* de pájaros, Leger aspira con una pipeta un poco de solución fisiológica oxalatada (agua: 100 ml + ClNa: 0,8 + oxalato potásico: 0,28 g) y después un volumen igual de sangre.

Debe saberse hacer el diagnóstico en el hombre y en los animales, examinando directamente la preparación, sin tinción previa. Este tipo de diagnóstico no presenta particulares dificultades cuando se conoce a fondo el manejo del sistema

de iluminación del microscopio y el saber accionar adecuadamente el diafragma iris.

Extracción de la sangre. — En el hombre se saca la sangre de la yema del dedo o de la cara dorsal, debajo de la uña. En los pájaros pequeños, se punciona sin peligro una vena de la pata o del ala; la vena que pasa sobre el fémur, por encima de la rodilla; si se trata del ala, se coge la gran vena que pasa oblicuamente sobre el húmero.

Diagnóstico del paludismo en extractos frescos. Esta observación requiere la obtención de preparaciones perfectas, en las que los hematíes, queden bien planos, no apilados y ligeramente separados unos de otros o muy cercanos. Es inútil perder el tiempo observando preparaciones que no presenten estas características, a no ser que se observen enseguida los voluminosos parásitos pululando por la muestra, lo cual hace que el diagnóstico sea evidente.

Búsqueda de formas juveniles. — Por su tonalidad blanquecina, por su aspecto opaco, destacan sobre el fondo amarillo paja del hematíe, así como por su contorno bien definido. Cuando estas formas son anulares, la vacuola central deja apreciar, por transparencia, la tonalidad amarillenta del hematíe; una parte del anillo suele ser generalmente más gruesa. Cuando existe pigmento únicamente se encuentran uno o dos granos. La observación y búsqueda de estas formas juveniles, en fresco, es extremadamente difícil, incluso para los microscopistas más expertos.

Plasmodios adultos. — Se observa muy bien el parásito hialino que llena totalmente el hematíe: la presencia del pigmento es patognomónico. En este caso el diagnóstico específico es relativamente fácil. El *Plasmodium vivax* produce una gran hipertrofia globular, el hematíe se ve invadido por seudópodos muy móviles. El pigmento se presenta bajo forma de delicados bastoncitos de color pardo-rojizo, muy visible en las formas gigantes. El *P. malariae* por el contrario atrofia el eritrocito, tiene escasa motilidad y su aspecto es muy compacto; el parásito es siempre mucho más pequeño, menos difuso; el pigmento se presenta bajo forma de granulaciones irregulares, más voluminosas y de color marrón chocolate.

Gametos. — Los cuerpos en forma de croissant o media luna siempre tienen una forma muy especial y encierran una masa de pigmentos en su parte media; presentan en la zona del hilio un resto globular. Los gametos esféricos llenan totalmente el eritrocito y siempre están repletos de pigmento.

Leucocitos pigmentados. — Son altamente importantes, pueden hallarse en número muy escaso, incluso en los casos más graves. Para reconocerlos sin error posible ante todo debe asegurarse de que presentan un voluminoso núcleo y no deben confundirse con las células epiteliales de núcleo pequeño que provienen eventualmente de la piel. Los leucocitos pigmentados (o melaníferos) son casi siempre grandes mononucleares (monocitos), con núcleo redondeado o en forma de herradura.

Establecido este punto, debe observarse el pigmento, siempre abundante; se presenta siempre en forma de bastoncillos o masas irregulares. No debe confundirse con el polvo que puede contaminar las preparaciones, y que se halla superpuesto a los leucocitos y no incluidos en su protoplasma, disperso por toda la preparación y no localizado en un punto o área. El pigmento libre es excepcional.

Lutz hizo observar cómo la sangre digerida por las bilharcias es eliminada en los vasos sanguíneos y fagocitada, de ahí que pueda confundirse con el pigmento palúdico.

Con *luz polarizada* el pigmento palúdico se muestra birrefringente; esta propiedad permite descartar cualquier otra hipótesis en caso de duda, pero debe utilizarse una fuente lumínica intensa, dado que este pigmento es muy opaco y débilmente birrefringente. El pigmento cutáneo también puede inducir a error, pero nunca presenta forma bacilar y no es englobado por los leucocitos.

El empleo del campo oscuro puede ser útil, sobre todo para la búsqueda y localización de los parásitos pigmentados y de los leucocitos melaníferos. El pigmento aparece bajo la forma de granulaciones altamente brillantes.

Causas de error. — A continuación se indicarán algunas estructuras que puedan ser causantes de cometer errores, por lo que es preciso tenerlas en cuenta.

1) *Vacuolas y hendiduras* de los hematíes. — Pueden confundirse, pero no tienen los contornos nítidos, ni gruesos, ni el aspecto blanquecino y opaco de los auténticos parásitos. Las hendiduras tienen siempre una tonalidad rojiza y una particular refringencia.

2) *Dentellados.* — Su presencia puede hacerlos dudar cuando no aparecen en la periferia, sino en la superficie del eritrocito. Moviendo el tornillo micrométrico vemos cómo pasan de brillante a oscuros. Por lo que deben considerarse como elevaciones de la superficie y no como corpúsculos internos. Puede tratarse de acantocitos o de equinocitos.

3) *Hematoblasto.* — Pueden confundirse con parásitos en el caso de hallarse superpuestos a los

hematíes. Pero se trata de masas granulosas difusas que no tienen el aspecto opaco y el contorno bien definido de los auténticos parásitos.

4) *Falsos flagelos o «hematexodias»* que se forman al cabo de algún tiempo, a expensas de hematíes de sangre anémica y se desprenden para flotar en el líquido de la preparación. Los auténticos flagelos son más largos, más gruesos, móviles y se forman a expensas del gameto pigmentado.

5) *Hematíes plegados* o contorneados pareciendo gametos en croissant o media luna, pero carecen de pigmento.

Examen después de tinción

Extensiones o frotis desecados. — Proceder a hacer estas extensiones siguiendo el método indicado en las pp. 136 y 139.

La fijación y la tinción se harán siguiendo una de las numerosas variantes del método de Romanovsky (p. 219). Entre estos procedimientos, los que a mi juicio ofrecen mejores resultados son los métodos panópticos así como las mezclas tamponadas.

Para hacer un *diagnóstico rápido*, emplear el excelente método de Sabrazès (tinción posvital con azul de metileno al 0,2 %).

Cuando se trata de *extensiones malas, irregulares,* W. H. Hoffmann aconseja el alcohol metílico como fijador de la parte más delgada, seguidamente teñir el conjunto con el Giemsa diluido: la parte espesa carece de hemoglobina y es más clara.

■ RETINCIÓN DE ANTIGUAS EXTENSIONES DESTEÑIDAS. — G. Giemsa recomienda el siguiente procedimiento: desecar fuertemente los portaobjetos, volverlos a teñir siguiendo la técnica ya descrita y habitual, y diferenciarlos con el fosfato monosódico, al que se le han añadido trazas de eosina.

CONSERVACIÓN DE LOS FROTIS TEÑIDOS. — G. L. Pawan y F. B. Queen aconsejan recubrirlos con una solución ligera de parafina en xilol o tolueno.

Gotas gruesas. — El método de las *gotas gruesas* ha sido muy discutido. Actualmente todos están de acuerdo en reconocer su interés como técnica de diagnóstico.

Propuesta inicialmente por Ross en 1903 este procedimiento ha sido modificado en diversas ocasiones, sobre todo por James en 1912. Las sucesivas modificaciones se han basado fundamentalmente en el proceso de eliminación de la hemoglobina. Ross empleaba el agua destilada o el mismo colorante. James recomendaba el alcohol clorhídrico (diez gotas por 50 ml), también se ha utilizado el líquido de Ruge a base de ácido acético. El agua despega la capa de sangre y los líquidos ácidos dificultan mucho las tinciones, si no han sido eliminadas previamente por un cuidadoso lavado.

1.° **Extensión de la sangre.** — Depositar en el extremo del portaobjetos una gruesa gota de sangre. Extenderla circularmente con el instrumento que ha servido para extraer la sangre o hacerla deslizarse con otro hasta el extremo opuesto. La capa de sangre debe tener un grosor uniforme y cuanto más delgado mejor.

En ciertos laboratorios se utilizan *extensiones mixtas*. Se extiende la gota gruesa circular en un extremo del portaobjetos (Sinton, Barber) y se extiende una delgada capa hasta el otro extremo del portaobjetos.

2.° **Desecación.** — Dejar el portaobjetos totalmente plano y dejarlo secar al aire, protegido del polvo.

3.° **Deshemoglobinización o lacado.** — Puede utilizarse uno de los procedimientos anteriormente mencionados, pero cada vez más se tiende a suprimirlos dado los inconvenientes que presentan y a confundir este tiempo con el de la tinción.

4.° **Tinción.** — Cubrir simplemente el frotis con Giemsa diluido: una gota por 2 ml de agua destilada neutralizada. Puede utilizarse el Giemsa lento. La deshemoglobinación tiene lugar a la vez que se tiñe. Teñir de treinta minutos a una hora.

Para acentuar los contornos de los leucocitos y de los parásitos J. W. Field aconseja sumergir, antes de la tinción, los portaobjetos durante un segundo en azul de metileno al 0,5 % (pH: 7,2).

Si se hacen extensiones mixtas, delgadas y gruesas, se utilizará el método panóptico, tomando la precaución de fijar con el May-Grünwald, únicamente la parte delgada. Seguidamente se recubren con Giemsa, diluido en la proporción que hemos indicado, las dos partes del frotis mixto.

5.° **Lavado.** — Expulsar suavemente el colorante con agua vertida con la ayuda de una pipeta, escurrir y dejar secar en posición plana o en ranuras. No debe verterse el colorante pero sí extraerlo con el agua, de manera que arranque el precipitado y sobre todo la película que se forma a la superficie del Giemsa, durante la tinción lenta.

Método de W. D. Gingrich (1941). — El principio de este método consiste en hacer el lacado al

mismo tiempo que la tinción, posteriormente se fija con el colorante en solución alcohólica.

Sin fijar, *tinción-lacado* en quince minutos con el Giemsa diluido, de una a tres gotas por mililitro de agua destilada neutralizada; lavar con agua y secar; recubrir el portaobjetos con el May-Grünwald (o sumergirlo dentro del colorante) durante treinta segundos: lavar con agua y dejar secar.

Se sabe que el Giemsa es una solución alcohol-glicerinada, mientras que el May-Grünwald está disuelto en metanol.

En el caso de las *extensiones mixtas* (gota gruesa y extensión delgada), hacer la tinción-lacado por inmersión vertical en un frasco de Borrel que contenga justo la cantidad de colorante necesaria para cubrir la gota espesa. Después de quince minutos escurrir y sumergir todo el portaobjetos en el May-Grünwald durante treinta segundos, lavar y sumergir la parte delgada del frotis con el Giemsa durante quince minutos. Lavar y secar.

Estas tinciones se conservan muy bien; pueden montarse en resinas sintéticas.

Método de tinción-lacado con el azul de metileno. El principio de este método es el de asociar el azul de metileno con una sustancia capaz de disolver la hemoglobina de los hematíes. De esta manera puede efectuarse al microscopio la búsqueda de parásitos sanguícolas en gotas de sangre muy espesas, con interés para el diagnóstico de afecciones parasitarias; gracias al *lacado*, producido por la sustancia hemolítica, la preparación es transparente, mientras que los parásitos, intensamente teñidos de color azul, se hacen más visibles, aun a pequeños aumentos. Estos elementos, así como los leucocitos y los reticulocitos, se tiñen positivamente con el azul de metileno.

Las ventajas de este procedimiento son múltiples. No solamente sustituye el tradicional examen en vivo, totalmente inoperante cuando los parásitos son escasos en la sangre periférica, sino que facilita considerablemente el empleo de la gota espesa, a la vez que proporciona una considerable ganancia de tiempo. Dado que este colorante no ha sido diluido, eliminamos las posibles impurezas que aporta el agua y que pueden ser motivo de artefactos. La posibilidad de emplear combinaciones ópticas a seco aumenta mucho el campo de observación del microscopio y por consiguiente facilita la tarea de la búsqueda de parásitos escasos.

Las preparaciones no están desecadas, pero son examinadas entre porta y cubreobjetos, bajo forma de gotas líquidas más o menos voluminosas. Para esta observación se emplean combinaciones a seco que dan aumentos de 80 a 200 o incluso 350 diámetros, sin tener que recurrir a los objetivos de inmersión, por lo que resulta una simplificación.

Es evidente que este método no podría sustituir las extensiones desecadas y su tinción con colorantes neutros del tipo del Giemsa, para poder llevar a cabo una correcta visualización de la morfología de los parásitos sanguíneos. Se trata sólo de descubrir en la sangre la presencia de tripanosomas, organismos espiralados o los plasmodios del paludismo, para su diagnóstico.

Este procedimiento de la tinción-lacado fue publicado por H. Simons en 1938. Publicaciones más recientes de este mismo autor han dado a conocer un nuevo colorante, el *azul tedán (Thedan-blau),* a base de azul de metileno y producen el lacado por acción de una saponina particularmente activa. Por otro lado, la casa Geigy (de Basilea) prepara un tipo especial de azul de metileno, que lleva un aditivo hemolítico y humectador que permite obtener preparaciones en gotas líquidas de distinto espesor, según el método del Dr. R. Suter y al igual que en la técnica de Simons.

El azul tedán de Simons es fabricado por Negociateur, de Münchenstein, cerca de Basilea, bajo dos fórmulas distintas: T3 y T5. La T3 sirve sobre todo para la observación entre porta y cubreobjetos, la T5 para la preparación de lo que Simons denomina pequeñas gotas gruesas y gotas líquidas ultraespesas.

El azul de metileno con un 2 % de agente humectador G. 10 320 AC es preparado por Geigy en Basilea bajo forma de polvo que basta diluir en la proporción de 1 gramo por 100 ml de agua destilada, tras mezclar sobre el portaobjetos con la sangre.

Métodos de H. Simons. — **Examen en vivo al T3.** — 1) Depositar sobre el portaobjetos de 1 a 2 asas de T3 (asa de 1 mm, 5 a 2 mm de diámetro), muy próximas entre sí.

2) Con el asa todavía húmeda de colorante añadir un asa de sangre. Mezclarlo todo bien con la misma asa, durante unos segundos, y con suma precaución recubrir la gota con el cubreobjetos.

3) *Observar* en una combinación en seco, emplear de 80 a 120 aumentos para la localización de tripanosomas y trabajar de 200 a 360 aumentos para localizar espiroquetas sanguíneas, formas pigmentarias de plasmodios palúdicos, gametos en forma de media luna y los leucocitos pigmentados. El lacado se observa bien a simple vista, iluminando únicamente la preparación.

Pequeñas gotas gruesas al T5. — 1) Depositar un asa (de diámetro igual al anteriormente utilizado) de T5 sobre un portaobjetos.

2) Sumergir el asa todavía húmeda del colorante en la sangre y mezclarlo bien con el colorante, continuar esta maniobra hasta que se hayan introducido de 4 a 5 gotas de sangre en la gota de T5.

3) Depositar suavemente un cubreobjetos y obsérvese, como en el caso de T3.

Las preparaciones con T5 contienen muchos más leucocitos y reticulocitos que las preparaciones del T3 con sangre fresca.

Teniendo en cuenta estas condiciones particulares, se encontrarán fácilmente los tripanosomas y las espiroquetas, aunque se encuentren en menor número. En caso de que la tinción parezca excesivamente débil, puede añadirse un asa de T3.

Pequeñas gotas secas de T3. — Cuando a causa del microscopio no puedan examinarse gruesas gotas de líquidos puede recurrirse a preparar con el T3 gruesas gotas desecadas, fáciles de conservar sin que crezcan mohos. Las gotas preparadas de esta manera no pueden despegarse ni agrietarse y el fenómeno de la *flotación oculta de parásitos* no puede producirse (ver más adelante).

1) Depositar dos asas de T3 sobre un portaobjetos, después dos asas de sangre y mézclese bien, de manera que se cubra una superficie de unos 20 mm^2 (con un asa de 2 mm de diámetro). Pueden colocarse de 2 a 3 gotas espesas por portaobjetos.

2) Dejar secar al resguardo del polvo, a temperatura ambiente, o algunos minutos a la estufa a 37° o al sol (las gotas de T3 no son atacadas por las moscas).

3) En el momento de usar, cubrir la capa de sangre desecada con una gota de agua corriente y depositar cuidadosamente el cubreobjetos. Examinar como en el caso anteriormente descrito, en fondo claro (tripanosomas, plasmodios) o en fondo negro (espiroquetas). También pueden seguidamente teñirse estas gotas con Giemsa.

Flotación oculta de parásitos. — H. Simons designa bajo este nombre un fenómeno que descubrió y que puede ser causa de un grave error y que parece haber pasado inadvertido hasta entonces por todos los investigadores. Las gotas espesas, preparadas siguiendo la técnica rutinaria, no se fijan, a fin de no interferir con la deshemoglobinización (o lacado). Según Simons, los parásitos, como consecuencia de la deshidratación, se localizan muy cerca de la superficie de la gota espesa, y pueden, durante la tinción y después durante el lavado que sigue, desprenderse sin que uno se aprecie de ello y sin que la capa de sangre parezca deteriorada. Las experiencias explicadas por Simons han demostrado que, en efecto, se produce una notable pérdida de parásitos; ello puede constatarse centrifugando el colorante eliminado y las aguas de los sucesivos lavados. Esta flotación puede llegar a representar una pérdida de hasta un 20 % de los parásitos y constituye pues una grave causa de error cuando los parásitos se encuentran en escaso número. La desfibrinación de gotas gruesas se ha manifestado como una mala práctica dado que favorece la flotación.

La técnica de la tinción-lacado y la práctica de las gotas líquidas ultraespesas, según Simons, suprimen este defecto, así como evitan el despegue y agrietamiento, tan frecuentes, de la gota de sangre.

Gotas líquidas, muy gruesas de T5. — Para H. Simons, se trata del procedimiento ideal de diagnóstico seguro y rápido para el estudio de tripanosomas y espiroquetas sanguíneas en los exámenes en grandes series. Permite examinar por entero gotas muy gruesas, sin deformación de parásitos, como en el caso de las gotas espesas desecadas.

1) Extraer 100 mm^3 de sangre, lo cual corresponde a 3 o 4 gotas, y extenderlas de forma circular en medio del portaobjetos, con máxima precaución para evitar la desfibrinación.

2) Llamear el asa al rojo y tras enfriamiento depositar cuatro gotas de T5 en cuatro puntos periféricos a la gota gruesa de sangre y mezclarlo todo con sumo cuidado.

3) Tomar una quinta asa de T5 y mezclarla bien con el conjunto. Si el lacado es incompleto a los cinco o diez segundos, añadir una nueva asa de T5. Generalmente debe tomarse algo más de colorante del estrictamente necesario para el lacado.

4) Depositar sobre la gota de mezcla un gran cubreobjetos o dos pequeños, con precaución y sin apoyar.

5) *Observación.* — Con óptica en seco y tomando algunas precauciones especiales, a causa del grosor de la preparación. Enfocar la cara inferior del cubreobjetos, que está en contacto con el líquido, o sobre los leucocitos más superiores. Bajar lentamente el tubo, accionando el tornillo micrométrico. Cuando se ha llegado a la parte inferior de la gota, desplazar el campo de observación, volver a accionar el tornillo micrométrico en sentido contrario, de forma que elevamos lentamente el tubo. Examinando de esta manera y metódicamente toda la superficie y espesor de la gota, se llegan a visualizar los tripanosomas presentes, gracias a su tonalidad azulada, incluso a escasos aumentos (50 a 80 diámetros) para el observador experto son suficientes, y de 100 a 120 aumentos para los principiantes). Emplear la luz diurna o la luz artificial, con o sin filtro amarillo, pero *nunca con filtro azul*. Diafragmar convenientemente.

A fin de facilitar la búsqueda y disminuir el tiempo de observación es recomendable diseñar una cámara profunda mediante un cubre de 16 × 16 o de 18 × 10 que dotamos de cuatro pies en los ángulos; estos cortos pies son de plástico fundido que actuarán de soporte (ver figuras 91 y 152).

Si la absorción de la luz es demasiado intensa, presionar ligeramente la superficie del cubreobjetos a fin de aplastar los soportes y eliminar el exceso de líquido con ayuda de un papel de filtro.

A fin de facilitar la observación, en el estudio de grandes series puede colocarse la preparación durante diez minutos en la estufa a 37-40° o varios minutos al sol. De esta manera generalmente se produce una agrupación o enriquecimiento de los parásitos en un mismo plano.

Debe tenerse presente que estas preparaciones únicamente pueden conservarse de seis a veinticuatro horas.

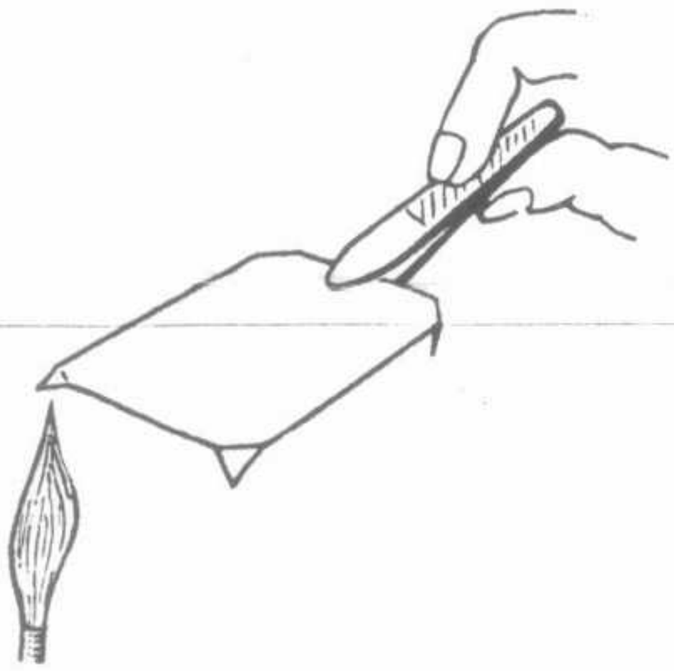


FIG. 152. — *Preparación de una cámara de Legendre por fusión de las esquinas de un cubreobjetos que será colocado sobre el objeto sin aplastarlo; comparar con la versión más perfeccionada de la figura 91.*

Método de R. Suter. — Este método es más sencillo que el de Simons, en el sentido de que el colorante es único, pero puede variarse entre grandes límites el contenido de agente humectante, según el material a teñir.

El colorante habitualmente utilizado está formado por:

Solución acuosa saturada de azul de metileno: 10 ml + agua destilada hasta 100 ml + agente humectador G. 10 320 AC de Geigy: 0,1 g.

El pH de esta disolución es de 7,5 a 8, pero puede variarse según los casos. El poder humectante aumenta con la temperatura. Puede también ser intensificado por adición de sales neutras.

1) Depositar sobre un portaobjetos un asa de sangre.

2) Añadir 3 asas de colorante, preparado como se ha indicado anteriormente y mézclese bien. La relación sangre/colorante debe ser de 1/2.

3) Depositar cuidadosamente el cubreobjetos y obsérvese como en el caso anteriormente descrito, en combinación a seco.

Plasmodios. — Los tres parásitos del paludismo *(vivax, malariae, falciparum)* no pueden llegar a distinguirse más que por el método del lacado. Efectivamente, sólo tiene lugar una débil tinción con el azul de metileno, por lo que las fases no pigmentadas pueden ser fácilmente confundidas entre sí o con los reticulocitos. Por el contrario, las *fases pigmentadas* (esquizontes, rosetas y gametos, sobre todo los *gametos en forma de media luna*), así como los leucocitos pigmentados son perfectamente diferenciables.

Empleo del campo oscuro. — La gran ventaja del campo oscuro se da únicamente cuando se utiliza juiciosamente. Aquí lo trataremos bajo el aspecto de su utilización en el estudio de la sangre, de preparaciones teñidas con la tinción-lacado a base de azul de metileno. Incluso entonces, no presenta ninguna ventaja para la búsqueda de los tripanosomas, los cuales, dada su coloración azulada, son fáciles de localizar en fondo claro. Según Simons, no es útil en el caso de las observaciones en vivo, no teñidas, de la sangre, del líquido cefalorraquídeo o del jugo ganglionar; efectivamente es necesario, en todos estos casos, no utilizar más que preparaciones, entre porta y cubreobjetos, extremadamente delgadas, a fin de evitar los fenómenos de difracción producidos por los leucocitos y los hematíes, fenómenos que pueden enmascarar los parásitos, cuando éstos se hallan en número muy escaso. El lacado elimina esta causa de error y permite examinar en campo oscuro las preparaciones algo gruesas.

La búsqueda de espiroquetas queda muy simplificada en campo oscuro, por el *efecto Berek* o de la *imagen luminosa (Leuchtbild)*. Tras la tinción lacada con el azul de metileno, todos los parásitos así teñidos, y sobre todo las espiroquetas, dan sobre el campo oscuro una imagen luminosa, de un color rojo más o menos intenso que destaca sobre el fondo negro de la preparación y es fácilmente observable: los *reticulocitos* aparecen de color rojo claro o púrpura y los leucocitos azul rojizos.

El *efecto Berek* se manifiesta en las preparaciones de gota líquida muy espesa, gracias al lacado que aclara el fondo. Tal como ha señalado Simons, todos los obstáculos de la técnica primitiva del fondo oscuro (grosor especial de los portaobjetos y de las preparaciones con aceite de inmersión o teñidas, lámpara a arco, etc.) se encuentran eliminados y el empleo del fondo negro gracias a la tinción-lacado es casi tan sencillo y cómodo como la observación en fondo claro. La otra simplificación ha sido el poder utilizar una combinación en seco, en lugar de los objetivos de inmersión.

La *microfluoroscopia* ha sido aplicada al estudio de los *Plasmodium*. F. Boch y M. Oesterlin han utilizado diversos fluorocromos, en solución al 0,1 % (tiempo de tinción cinco minutos) para el estudio del paludismo del hombre y de los ani-

males. Los colorantes utilizados son: rivanol, tripaflavina, atebrina, auramina, primulina. Estos autores los han hecho actuar bien sea como colorantes vitales, bien sea sobre frotis, o en el caso de la atebrina por inyección intramuscular, asociada a la quinina, en monos infectados.

Cuando se tiñe con las acridinas (atebrina, rivanol y acriflavina) los frotis deben ser fijados con alcohol metílico.

En el caso de la primulina debe añadirse un 2 % de fenol y teñir las preparaciones no fijadas: se trata de un colorante específico de los lípidos.

En el caso de la auramina debe disolverse el colorante en alcohol metílico. Teñir las preparaciones no fijadas y lavar con alcohol metílico, y posteriormente con agua, a fin de evitar la formación de precipitados.

Diagnóstico del paludismo sobre las extensiones desecadas y teñidas con el Romanovsky. — No es éste el sitio adecuado para describir la morfología de los plasmodios que podemos encontrar en las preparaciones. Sólo haremos referencia a determinadas cuestiones que pueden inducir a error.

Independientemente de la forma y del volumen de la estructura examinada, para que sea un plasmodio, debe distinguirse nítidamente una parte *azul* y una parte *roja*.

En las formas juveniles, las más difíciles de encontrar, deberemos observar este núcleo rojo y este citoplasma azul: los anillos presentarán una vacuola incolora o de color azul muy pálido. En caso de no apreciar estas características no se podrá precisar que se trate de un plasmodio.

La presencia del pigmento, además de las características cromáticas que acabamos de mencionar, tipifican las formas adultas.

Causas de error. — 1) Una de las principales causas de error es debida a la presencia de *hematoblastos* superpuestos a los eritrocitos. Cuando se encuentran individualmente sobre un hematíe parecen una forma juvenil del parásito; en el caso de haber varios pueden confundirse con los merozoitos que poseen un corpúsculo en roseta.

Deben reconocerse bien estos corpúsculos, recordar que presentan un contorno difuso, un contenido granuloso y que se tiñen uniformemente de color violeta, si bien en el centro hay una tonalidad más sostenida. Nunca presentan un nítido contraste entre el rojo y el azul, como presentan los auténticos parásitos.

Un grupo de hematoblastos puede confundirse con un gameto, pero la falta de pigmentación indicará que no se trata de lo que inicialmente se había supuesto.

2) *Vacuolas teñidas.* — En ocasiones son muy frecuentes, sobre todo cuando la extensión no se ha efectuado correctamente, por excesiva exposición de la gota de sangre al aire. Pueden tener un contorno nítido y un aspecto granuloso; sin embargo, nunca presentan las zonas azul y roja, características de los parásitos.

3) *Hematíes con granulaciones basófilas.* — Podrían ser confundidas con las granulaciones de Schüffner, pero no tienen pigmentación roja ni tampoco sus dimensiones y no van acompañadas del parásito.

4) *Falsos flagelos.* — C. A. Hannum y H. H. Mitchell han demostrado que determinadas técnicas, altamente sofisticadas, como el método de Oliver, pueden producir filamentos mielínicos o hematexodios o falsos flagelos, se trata de artefactos.

5) *Flagelados (Herpetomonas).* — Proceden de eyecciones de moscas, sobre todo en el caso de las gotas gruesas y largo tiempo expuestas al aire.

6) Únicamente mencionaremos, como posibles fuentes de error: los normoblastos con granulaciones basófilas, los restos de núcleos leucocitarios, los hematíes en forma de media luna, los propios leucocitos y, finalmente, los corpúsculos extraños de la piel, bajo forma de levaduras, bacterias, polvo, pigmento, etc. En todos los casos deberá buscarse si realmente hay parásitos con la doble tinción: roja y azul, así como la presencia de pigmento.

Punción medular. — Según L. C. Brumpt, la punción esternal no es en cuanto a información, superior a la observación de la sangre en el paludismo agudo. Lo mismo ocurre en el caso de las formas crónicas con lo que hace referencia al hallazgo de parásitos, pero el mielograma proporciona elementos de diagnóstico de gran interés: mononucleosis, monocitos melaníferos, masas de pigmento.

Extensiones húmedas. — Sólo tienen interés para estudiar la estructura del núcleo tras una tinción con la hematoxilina férrica. Para el resto de los detalles morfológicos, los frotis desecados y teñidos con el Romanovsky dan excelentes preparaciones.

Para evitar la formación de la laca férrica que dé opacidad a los hematíes e impida ver con nitidez los parásitos, es necesario emplear un fijador que asegure la deshemoglobinización como aconseja Sinton y Mulligan. Se utilizará pues el Carnoy o el fijador de Gilson. Las extensiones pueden hacerse directamente sobre el cubreobjetos que se depositará cara abajo sobre el líquido fijador. Teñir siguiendo la técnica clásica de Heidenhain o por la de Dobell.

Índice parasitario. — Se establece mediante la *observación microscópica de la sangre*. El material indispensable para efectuar la toma de sangre es:

200 portaobjetos como mínimo.

100 ml de alcohol de 90°.

Vaccinostilos o plumas de acero extrafinas.

Fichas perforadas, del modelo universalmente empleado para efectuar las encuestas epidemiológicas; una pinza especial permite transformar la perforación en una señal; de esta manera, con un triángulo y de una vez pueden seleccionarse todas las fichas correspondientes a un dato (edad, raza, fecha, etc.).

Para extraer la sangre, se utiliza el vaccinostilo o se rompe el extremo de una pluma y se coloca en una pinza tipo fórceps. Cada pluma permite hacer dos tomas de sangre, cada pico sirve únicamente una vez. También pueden aprovecharse las sesiones de vacunación para recoger la sangre a nivel de una de las escarificaciones que se hace algo más profunda.

Deben hacerse frotis delgados y extensiones gruesas.

Para cada individuo observado se anotará en su *ficha*: fecha, nombre, edad, sexo, color, raza, dimensiones del bazo (en estación seca y en estación húmeda), etc. Debe tomarse la precaución de trazar el número de la ficha sobre la capa de sangre de la preparación, para ello se utilizará cualquier objeto punzante o simplemente un lápiz muy duro.

Para determinar la intensidad de la infección de manera precisa y poderla reflejar sobre la ficha, Sinton ha propuesto un método análogo al que ha sido empleado por Wright, y luego por Dreyer, para evaluar la concentración de las suspensiones bacterianas.

Se prepara inicialmente una suspensión titulada de hematíes de ave (gallina), que contiene 20 000 eritrocitos por milímetro cúbico. Para ello se hace una mezcla de sangre de ave y una solución de bicloruro de mercurio al 1,3 % en suero fisiológico al 0,85 %. Al cabo de una hora se centrifuga y se sustituye el líquido por una solución al 4 %. Al cabo de diez horas se lava dos veces sucesivas con el suero fisiológico, centrifugando entre uno y otro baño; se conserva en una solución de suero fisiológico al 0,3 %.

Por dilución y numeraciones sucesivas se llegará a conseguir una suspensión que contendrá exactamente 20 000 hematíes por milímetro cúbico. Esta suspensión puede conservarse durante años.

Para la numeración se emplean pipetas capilares del tipo Widal, llevando una señal aforada a 2 centímetros del extremo del capilar. Con una tetina se aspira sucesivamente hasta llegar al aforo, primero la sangre del enfermo y después la suspensión de eritrocitos de ave, teniendo la precaución de secar cuidadosamente el extremo de la pipeta cada vez que se hace una operación. Finalmente, hacer tres gotas espesas sobre otro portaobjetos y extenderla en frotis delgado, lo que queda sobre el primer portaobjetos, que servirá para hacer la forma leucocitaria y el estudio de los parásitos. Dejar secar y teñir con el Giemsa, sin fijar ni deshemoglobinizar. Lavar y observar.

Numeración. — Para saber el número de parásitos por milímetro cúbico en la sangre del enfermo basta determinar la relación entre el número de parásitos y el de hematíes de ave. Sabiendo que la suspensión contiene 20 000 unidades por milímetro cúbico si, por ejemplo, se encuentra una media de 350 parásitos por 1000 hematíes de gallina, una regla de tres dará el número buscado:

$$\frac{20\,000}{1} \times \frac{350}{1000} = 7000 \text{ parásitos por milímetro cúbico.}$$

La numeración debe hacerse con un ocular de cuadrícula y deben medirse numerosos recuadros para finalmente obtener la media.

A fin de obtener, sobre frotis teñidos, la *exflagelación* de los plasmodios humanos, S. P. James ha establecido una técnica especial (método de Shute). Preparar dos cámaras húmedas, colocando papel de filtro mojado en las dos caras de la caja de Petri y calentarlas previamente durante 2 horas a +25°. Hacer cuatro series de frotis húmedos con la sangre de un enfermo apropiado, depositarlas en las cajas de Petri y dejarlas a la estufa a 25° durante quince minutos, veinte, veinticinco y treinta minutos. Retirarlas sucesivamente al cabo de los minutos indicados, secar rápidamente y teñir. Contabilizar el número de exflagelaciones encontradas por cada 100 leucocitos: la comparación con la cifra de una enumeración leucocitaria previa da el número de exflagelaciones por milímetro cúbico.

Tinción de plasmodios y de otros protozoos a nivel de cortes. — W. J. Tomlinson y R. G. Grocott (1944) propusieron un método que parece superior a los restantes, se trata de la *floxina-azul de toluidina-naranja*.

En realidad, se trata de una modificación de la técnica de Mann a base de eritrosina-azul de toluidina (p. 245), técnica que también ofrece excelentes resultados y las preparaciones se conservan perfectamente. Estas técnicas con azul de toluidina tienden a sustituir la tinción con hematoxilina-eosina, insuficiente y ya en desuso para este tipo de estudios.

Colorantes

■ FLOXINA AZULADA

Floxina azulada	1 g
Agua destilada	100 ml
Cloruro cálcico al 1 % en agua	1 ml

■ AZUL DE TOLUIDINA POLICROMADA

Azul de toluidina	1 g
Carbonato de litio	0,5 g
Agua destilada	75 ml

Disolver y dejar madurar, de tres a cuatro días a temperatura ambiente, o bien de 12 a 24 horas a 37°.

Completar hasta 75 ml con agua destilada, añadir después 20 cm^3 de glicerina y 5 ml de alcohol de 95°.

■ DIFERENCIADOR NARANJA-COLOFONIA

Colofonia al 5 % en acetona	75 ml
Alcohol de 95°	25 ml
Naranja crómico al 1 % en agua destilada	0,5- 1 ml

Prepárese antes de usar con las soluciones de reserva.

El material debe ser preferentemente fijado con alcohol-formol al 10 % pero también puede utilizarse el Bouin o el Duboscq-Brasil. Cortar tras inclusión en parafina. Teñir durante 5 minutos con la floxina. Lavar con agua corriente. Teñir de 45 segundos a un minuto con el azul de toluidina policrómico. Lavar con agua y escurrir. Dejar actuar la acetona durante 2 min. Diferenciar durante 1 min con *ácido acético* al 0,2 %. Lavar con acetona durante 2 min. Diferenciar de uno a diez minutos con el diferenciador naranja-colofonia. Acetona durante 3 min. Acetona-toluol, toluol-resina neutra.

Localización de piroplasmas, theilerias y anaplasmas. — La tinción de estos parásitos no presenta ninguna dificultad. Con todas las variantes de Romanovsky se obtienen hermosas preparaciones. Su búsqueda en estado fresco, por el contrario, no es nada fácil, debido principalmente al diminuto tamaño de los parásitos y a la ausencia de pigmentos. Cuando los parásitos son escasos, se efectuarán extensiones gruesas, siguiendo la técnica anteriormente descrita. El diagnóstico precoz de theilerosis y el estudio morfológico de los corpúsculos azules (corpúsculos en forma de granada): requiere una punción de bazo, de hígado, de ganglios linfáticos superficiales y de la médula ósea.

Localización y estudio de rickettsias. — En los vertebrados, las *rickettsias* se encuentran principalmente en las paredes de los vasos. Según Wolbach los tejidos más favorables para su estudio son la piel y el tejido subcutáneo de los monos y de los cobayos, así como las vainas conjuntivas de los tendones (peritenio) de los cobayos. No deben aplastarse los tejidos, únicamente disociarlos cuidadosamente, dado que es imposible hallar *rickettsias*, por abundantes que sean, fuera de las células. Por ello, es indispensable conseguir aislar un determinado número de células, sin aplastarlas. Puede conseguirse, por ejemplo, extendiendo la cara interior de la piel del escroto y rasparla suavemente con una cuchilla; recogido el material que queda depositado sobre la hoja de la cuchilla se extiende cuidadosamente sobre los portaobjetos. Fijar con alcohol absoluto y teñir de dos a cuatro horas con el Giemsa lento, diluido en la proporción de 1 gota por 1 mililitro cúbico de agua destilada.

■ MÉTODO DE CASTAÑEDA (1930). — Castañeda emplea, para teñir las extensiones de la mucosa vaginal de los cobayos, una modificación del método de Tilden diseñada para la tinción de treponemas.

■ MÉTODO ORIGINAL DE CASTAÑEDA

Solución tampón:

A. Fosfato monopotásico	1 g
Agua destilada	100 ml
B. Fosfato disódico + 12 H_2O	2,5 g
Agua destilada	100 ml

Mezclar las dos soluciones: el líquido tampón obtenido debe tener un pH de 7,5. Añadir 1 ml de formol para asegurar la conservación.

Colorante:

C. Azur de metileno	1 g
Alcohol metílico	100 ml

Coger:

Solución tampón	20 ml
Formol neutralizado	1 ml
Clorante C	15 ml

Colorante de contraste:

Safranina al 0,2 % en agua destilada	1 ml
Ácido acético al 0,1 %	3 ml

Teñir tres minutos las extensiones *no fijadas*, decantar el colorante y *sin lavar* diferenciar con

safranina durante tres a cuatro segundos. Lavar, secar.

P. Lépine simplificó esta técnica consiguiendo una variante de resultados más garantizados.

A. Solución de azur de metileno al 1 % en agua fenicada al 0,5 %.

B. Solución al 1 % de carbonato potásico.

En el momento de utilizar, preparar la siguiente mezcla:

Diez gotas de solución A + cinco gotas de solución B + 0,5 ml de formol neutralizado + 10 ml de agua destilada.

Sin fijar, teñir los frotis con este líquido durante tres a cuatro minutos. *Lavar* con agua corriente. *Diferenciar* con la solución de safranina al 0,1 %. Lavar. Secar. Las *rickettsias* quedan de color azul intenso sobre un fondo rosado.

■ Método de Lépine (1932). — P. Lépine abre el saco escrotal de los cobayos por la cara abdominal y raspa con un vaccinostilo la hoja parietal de la vagina a nivel de sufusiones hemorrágicas. Se extiende el producto del raspado en la parte central de tres portaobjetos sin descargar el vaccinostilo.

1) *Fijar* con formodicromato débil de Regaud durante cinco minutos.
2) *Lavar* con agua corriente.
3) *Teñir* durante uno a diez minutos con:

Pararrosanilina de Ziehl	3 ml
Fenol al 3 %	27 ml

4) *Lavar* con agua corriente.
5) *Diferenciar* durante dos a tres minutos con una solución acuosa saturada de pardo Bismarck filtrado.

El fondo de la preparación permanece incoloro, los leucocitos quedan de color pardo oscuro, las células endoteliales de color amarillo pálido, las *rickettsias* en rojo.

■ Método de Macchiavello (1937).

Reactivos:

1) Solución alcohólica saturada de pararrosanilina.
2) Tionina al 2 % en agua destilada.
3) Solución tampón (pH 7,4-7,6).

Fosfato monopotásico al 1 %	12 ml
Fosfato disódico al 2,5 %	88 ml

4) Ácido cítrico al 0,5 % en agua destilada.

Solución A. — Extender 1 ml de la solución núm. 1 con 250 ml de la solución tampón núm. 3 y filtrar con papel. Este colorante no es estable y por consiguiente debe prepararse justo antes de usar.

Solución B. —	Agua destilada	75 ml
	Solución cítrica núm. 4	25 ml
	Solución de tionina núm. 2	0,5 ml

Filtrar, se conserva bien, por lo que puede ya tenerse preparada con cierta antelación.

Tinción de la preparación no fijada durante tres minutos con la mezcla A, filtrar sobre el portaobjetos; *diferenciar* y teñir simultáneamente durante dos a tres segundos con la solución B.

También puede diferenciarse inicialmente durante dos a tres segundos con la solución cítrica núm. 4, después tinción de contraste, durante uno o dos segundos con el azul de metileno fenicado diluido al cuarto.

P. Giroud tiñe las *rickettsias* con el Giemsa caliente durante cinco minutos a una hora según los casos. Diluir el Giemsa con una solución tamponada hirviendo (ver p. 140, la tabla de los tampones). Debe tenerse en cuenta que R. Camain ha demostrado que las rickettsias y los gránulos de volutina tienen afinidades tintoriales muy parecidas, por lo que los métodos de tinción de Macchiavello y el Giemsa hirviendo no son más que técnicas prácticas de reconocimiento pero en ningún caso deben considerarse como criterios absolutos de diagnóstico.

En los artrópodos, las *rickettsias* se hallarán tanto en cortes de órganos como en las extensiones obtenidas atendiendo a los procedimientos anteriormente descritos, aislando los elementos celulares por técnicas de disociación. El melófago de la oveja está casi siempre parasitado por *rickettsias (R. melophagi):* se encuentran en las extensiones de contenido intestinal. En el piojo encontramos la *R. pediculi.*

E. Riès ha indicado que siempre se encuentra una *rickettsia* en el piojo de la gallina, *Menopon biscriatum*. P. Giroud y R. Martin han descubierto una nueva especie (no patógena), *R. sericea* en *Sericothrombium holosericeum*, en Francia.

Para la obtención de cortes de órganos o de animales vectores, debe fijarse forzosamente con el líquido de Zenker desprovisto de ácido acético y teñir con la técnica de Romanovsky, anteriormente descrita (método de Wolbach). Los tejidos se fijan durante veinticuatro horas, los órganos de artrópodos únicamente de dos a seis horas. Wolbach ha constatado que la fijación con el sublimado alcohólico impide la tinción de las *rickettsias* con el método de Giemsa.

Hertig y Wolbach utilizaron con éxito el método de Goodpasture y Burnett para teñir las *rickettsias* de los artrópodos.

Teñir los cortes, durante cinco minutos, en caliente, hasta que haya la emisión de vapores con:

Pararrosanilina: 0,5 g + fenol: 1 g + anilina: 0,5 g + alcohol de 30°: 100 ml.

Disolver la fucsina en alcohol y añadir los otros productos.

Lavar rápidamente con agua corriente. *Diferenciar* con algunas gotas de formol concentrado y puro. Lavar con agua y efectuar una tinción de contraste con el ácido pícrico saturado en agua. Deshidratar rápidamente y montar con bálsamo o equivalente.

P. Giroud y R. Martin han atraído la atención sobre los elementos rickettsiformes o *seudorickettsias* de la conjuntiva del conejo, se trata en realidad de bacilos fagocitados y desintegrados.

P. y M.-L. Giroud y M. Meunier diseñaron una técnica rápida para separar las *rickettsias* de los tejidos de las bacterias acidorresistentes. Emulsionar un triturado de pulmón infectado en aceites o en derivados terpénicos. Los restos celulares quedan retenidos por la emulsión y las *rickettsias* se recogen en el líquido subyacente. En el portaobjetos se localizan alrededor de la gota. El aceite que da mejor resultado es el de pino, aunque también pueden usarse los aceites de parafina y de cacahuete. Los bacilos acidorresistentes son retenidos en la emulsión.

Conservación por congelación. — I. T. Coggehall ha demostrado que se pueden conservar durante setenta días a –76° los plasmodios del paludismo a condición de que se congelen rápidamente.

B. — *COCCIDIOS*

Resulta bastante fácil obtener este tipo de material. La coccidiosis del conejo es relativamente frecuente en verano. En Estados Unidos ocurre algo parecido con respecto a la coccidiosis aviar. La localización de oocistos en las deyecciones permitirá diagnosticar los animales parasitados. A falta de *Eimeria stiedai* y *perforans* del conejo se podrá buscar el *Coccidium schubergi* en los miriápodos, como en *Lithobius forficalus*, frecuente bajo las piedras de nuestros bosques o bajo la corteza de los árboles y fáciles de conservar en cautividad. Es con esta especie justamente que Schaudinn hizo sus investigaciones sobre los coccidios. Para obtener este coccidio debe aislarse el tubo digestivo del miriápodo, disecándolo en una solución fisiológica, o más fácilmente cortando los dos extremos del animal, el cefálico y el caudal y estirando el intestino con ayuda de unas pinzas. Tras disociación se estudia en fresco o bien se fija el intestino y se estudia posteriormente sobre los cortes obtenidos tras la correspondiente inclusión.

También puede buscarse *Klossia helicina* en *Helix hortensis* o en otras especies de este mismo género; Thiry observó que los caracoles que tienen su peristoma marrón frecuentemente están más parasitados que los otros. Siguiendo la técnica descrita por Salomonsen debe procederse de la siguiente manera: se rompe la concha cerca del orificio opercular, a nivel de la segunda vuelta de espiral; se extraen los restos y se busca el pulmón y el corazón que se puede apreciar cómo late. Al lado del corazón se halla el riñón que tiene la forma de una masa fusiforme amarillenta y con la ayuda de unas pinzas y de tijeras se aísla. Se disocia en parte y se procede a fijar el resto.

En la costa, los *Aggregata* del pulpo y de la sepia proporcionan un material extraordinariamente interesante.

Observación en fresco. — Disociar el epitelio de los órganos parasitados, bien sea en una solución fisiológica o en el propio líquido visceral o en el suero del animal parasitado, o en la albúmina salada de Wasielewsky:

Agua: 200 ml + yema de huevo: 20 ml + sal de mar: 1 gramo.

Frotis. — Secos o húmedos; en el caso del hígado es mejor efectuar una aposición. Teñir con el Romanovsky o bien con la hemalumbre-eosina o con la hematoxilina férrica.

Cortes. — Fijar los órganos con el Bouin o con el Duboscq-Brasil, o con el sublimado acético el líquido de Flemming, según el resultado que se pretenda conseguir. Tinción a escoger según el fijador utilizado.

Localización de coccidios en los animales domésticos. — Nöller y Otten han aplicado el método coprológico de enriquecimiento de Fülleborn, perfeccionándolo, para la localización de los coccidios.

Se empieza por emulsionar con cuidado los materiales a estudiar, añadiéndoles progresivamente una solución *saturada* de sal marina, agitándolo continuamente con una espátula. Una vez obtenido un homogeneizado claro se pasa por un tamiz metálico de cuadrícula de 1 a 2 milímetros. También se vierte el sedimento sobre el residuo retenido sobre el tamiz, a fin de arrastrar la mayoría de los oocistos de los coccidios. Se recoge el líquido en un matraz cónico que debe ser llenado.

Una vez pasados unos cinco minutos pueden recogerse los oocistos de la superficie del líquido con un asa metálica. Al cabo de veinticinco a treinta minutos se han aglutinado.

Con este método se consigue un doble objetivo: los oocistos quedan flotando en la superficie de un líquido denso, seguidamente se agrupan en la estrecha abertura del matraz, en lugar de distribuirse por una amplia superficie, como ocurriría en el caso de utilizar un vaso de precipitados.

La proporción relativa de material sólido y de

líquido carece de importancia: puede incrementarse, sin representar ningún inconveniente, la cantidad de líquido cuando uno dispone de poco material, así por ejemplo, cuando se trabaja con animales de pequeño tamaño (roedores, insectívoros, pájaros, etc.). En este último caso se utilizan matraces de pequeño tamaño.

Este método también da buenos resultados cuando el material ha sido conservado en formol al 5 %. Por lo cual permite estudiar fácilmente todas las fases de la esporulación en materiales que han sido sucesivamente, a intervalos, fijados con formol.

Cauchemez utiliza con éxito una variante, mejorada, del método de Willis que describiremos más adelante en el capítulo de la técnica coprológica.

Crouch y Becker tiñen bajo el cubreobjetos o en un tubo los oocistos aislados de esta manera. Fijar de 5 a 10 minutos con ácido acético ligeramente calentado. Tinción con verde Janus al 0,1 % durante 10 minutos. Lavado con agua destilada, tinción de contraste con eosina en solución concentrada. Lavado con agua destilada. Observar los oocistos montados en una gota de agua.

C. – *GREGARINAS*

Estos protozoos se localizan en el intestino de numerosos invertebrados, principalmente de larvas de numerosos insectos. La larva de *Tenebrio molitor* (oruga de la harina) que fácilmente se obtiene en las piscifactorías y en los comercios que venden animales en ocasiones también en las panaderías, está casi siempre parasitada por una interesante especie de gregarina. En los testículos de lombrices (a nivel de los segmentos 11-13) frecuentemente se halla, sobre todo en primavera, la *Monocystis agilis*, especie muy móvil. La *Stylorhynchus longistris* es una hermosa gregarina que tiene tres segmentos y que vive en el intestino de los *Blaps mortisaga* adultos. En el intestino del bogavante frecuentemente se encuentra una gregarina gigante *(Porospora gigantea)*.

La *observación en fresco* es relativamente fácil. Para estudiar su locomoción puede colocarse en suspensión en el líquido un poco de carmín o un poco de tinta China. Las tinciones vitales ponen de manifiesto gránulos e inclusiones particulares de las gregarinas: los gránulos carminófilos se tiñen intensamente con el picrocarmín acético. El Lugol pone de manifiesto las inclusiones de paraglucógeno de Bütschli (quedando teñidas de color amarillo pardusco).

No es aconsejable hacer *extensiones*, dado el volumen de estos organismos. Es preferible montarlos en gelatina glicerinada, en jarabe de levulosa o en el jarabe gomoso de Apathy. Puede efectuarse una fijación con el tetraóxido de osmio o con la quinona al 0,4 %. Pueden también fijarse con formol al 5 % simple o ligeramente picricado y montarlos con dicho líquido, cementando el cubreobjetos con el betún de R. de Noyer que se mantiene bien y cierra herméticamente.

El estudio del contenido de esporocistos, por el contrario, conviene hacerlo por el método de frotis seco o preferentemente el húmedo. Se tiñe con el Romanovsky o con una solución de hematoxilina.

El material destinado a ser *cortado* será fijado con cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados. Para la tinción dará óptimos resultados la aplicación del *método de Mallory*. El estudio de la cutícula podrá efectuarse aplicando cualquiera de las técnicas de impregnación metálica, en oro o en plata.

D. — *MIXOSPORIDIOS*

Incluiremos en este grupo el de los microsporidios (con cnidosporas de cuatro núcleos y una cápsula polar), en el que se halla un importante parásito, el de la pebrina del gusano de seda, el *Nosema bombycis*. Como tipo de este grupo puede considerarse la *Pleistophora blattae,* parásito de los tubos de Malpighi de *Periplaneta orientalis* o la *Glugea anomata* del picón (*Gastrosteus aculeatus,* piel, branquias, ovario). Para poner en evidencia el filamento espiralado, guardar durante veinticuatro horas en la cámara húmeda con un poco de tintura de yodo. En las células nerviosas ganglionares del rape *(Lophius piscatorius)* se encuentra la *Glugea lophii* Dofl., que suele tener grandes quistes.

Las esporas de *Pleistophora periplanetae* son acidorresistentes. De esta manera, resulta fácil distinguirlas de la levadura de la cucaracha.

Los Mixosporidios propiamente dichos (cnidosporas con dos cápsulas polares) son frecuentes de la más diversa índole en los animales de sangre fría, si bien abundan en los peces y en crustáceos. Forman pequeños quistes en la superficie de los tegumentos, en los vasos sanguíneos, en las branquias, hígado, bazo, vejiga urinaria *(Myxidium lieberkühni* Bütschli, del lucio, *Esox lucius)* o en las aletas, etc., también se encuentran en los músculos *(Myxobolus pfeifferi* Thél., del barbo). También se podrán encontrar en la tenca y en la trucha.

Observación en fresco. — La disociación de los quistes o de las masas parasitarias muestran las esporas en las que pueden observarse las cápsulas polares y el filamento espiral. Para desenrollar este filamento se han propuesto numerosos reactivos: álcalis cáusticos (sosa o potasa), ácidos minerales (clorhídrico, nítrico, sulfúrico) u orgánicos (ácido acético), glicerina, éter, soluciones

yodadas o incluso agua destilada, así como jugos gástricos del huésped. En ocasiones, se deben extender las esporas sobre el portaobjetos y dejarlas secar al aire, antes de tratarlas con álcalis cáusticos o con los ácidos minerales; sólo de esta manera se consigue desenvainar el filamento polar. En ocasiones la putrefacción puede provocar el mismo resultado. Las esporas del *Nosema bombycis* son excesivamente resistentes a todos estos reactivos; Kudo considera que el agua oxigenada es el reactivo más eficaz, su acción es reforzada por la aplicación de álcalis débiles. La presión graduada entre portaobjetos y cubreobjetos da también buenos resultados. W. Trager obtiene la eclosión de estas esporas simplemente colocándolas en una gota de líquido del intestino de una oruga del gusano de seda.

La separación de las dos valvas de las esporas se obtienen por la acción de los mismos reactivos.

Frotis. — Preferentemente frotis húmedos.

Cortes. — Además de los métodos generales de tinción señalamos como muy interesantes los métodos de *Mallory*, de *Schuberg y Schröder*. Esta última técnica consiste en teñir los materiales en bloque con el carmín borácico; después de la inclusión en parafina se obtienen cortes de 3 a 5 μ y se tiñen, bien sea con un colorante básico de contraste (azul de metileno o verde de metilo) o con el *procedimiento de Blochmann*. Se hace una solución de azul de metilo al 0,05 % en una solución acuosa saturada de ácido pícrico y se tiñen los cortes en esta solución durante doce horas; después se lavan con agua, se deshidratan y se montan con bálsamo salicilado. Las valvas quedan amarillentas, el citoplasma y las cápsulas polares quedan de color verde y los núcleos rojos.

E. — *SARCOSPORIDIOS*

Los animales más frecuentemente parasitados son los ratones, el cerdo y la oveja. En los mataderos parisinos casi siempre se encuentran ovejas cuyo esófago está más o menos lleno de quistes de *Sarcocystis tenella.*

Los músculos de ratones infestados por *Sarcocystis muris* presentan un aspecto tendinoso muy particular. Puede obtenerse la infestación experimental de estos animales por ingestación de músculos de ratones parasitados o de excrementos (15 a 20 días después, a los 75 días ya no están infestados) (Th. Smith, L. Nègre, Negri).

La *observación en fresco* se hace disociando quistes en suero fisiológico, simple o ligeramente albuminoso. E. Césari recomienda extraer un fragmento de músculo y espolvorearlo con sal. Se deposita en un recipiente y se observa la serosidad rojiza que se desprende de él.

Los *frotis* desecados se tiñen muy bien con el método de Romanovsky y dan excelentes preparaciones de esporas. Se han descrito formas libres en la sangre.

Los *cortes* de los músculos parasitados se harán a partir de material fijado por los procedimientos habituales. La tinción puede hacerse con cualquiera de las técnicas rutinarias.

FLAGELADOS

Es necesario establecer, desde el punto de vista técnico, una distinción entre los flagelados libres y los flagelados parásitos.

Los primeros se consiguen examinando simplemente una gota de agua de una charca o por la observación de plantas acuáticas. Su fijación y tinción se hacen entre porta y cubreobjetos o en masa, mediante un centrifugador. Con este segundo sistema, puede también procederse a la inclusión en parafina del centrifugado previamente fijado y deshidratado convenientemente. Tras la inclusión se procede a la obtención de los cortes. Entre los fijadores recomendados debemos citar el líquido de Flemming, o el sublimado alcohólico, o el Duboscq-Brasil. La tinción puede hacerse con cualquiera de las modalidades de hematoxilina o con carmín. Para poner de manifiesto los flagelos pueden utilizarse métodos especiales.

Entre los flagelados parásitos debemos distinguir dos grupos: los flagelados del tubo digestivo y de las cavidades naturales y los flagelados hemáticos. Esta clasificación es totalmente arbitraria y únicamente responde a un criterio de manipulación técnica.

A. — *FLAGELADOS DEL TUBO DIGESTIVO*

Estos flagelados deben ser estudiados en fresco y en frotis, fijados o húmedos.

En el hombre, el estudio de los flagelados intestinales es de gran interés, ya que son posiblemente la causa de algunas enteritis rebeldes y mal conocidas. Por lo cual deben examinarse los excrementos frescos y buscar las formas libres o los quistes de los géneros *Trichomonas, Chilomastix, Giardia, Enteromonas, Embadomonas.*

La *Giardia intestinalis* parece ser uno de los parásitos más frecuentes. En el hombre generalmente se presenta en estado quístico y puede confundirse con quistes de amebas. Cuando estos parásitos son muy numerosos y provocan diarreas, los excrementos suelen ser amarillentos ocre, con vestigios de mucus, pero no contienen sangre y nunca presentan elementos celulares. Las *Giardia* generalmente abundan bajo la forma flagelada en el ratón y la rata, a nivel del intestino delgado. En el ciego del cobayo, de la rata, del ratón, así como en el de diversos monos se encuentran frecuentemente *Trichomonas*, en ocasiones muy abundantes. Estos flagelados son

sobre todo muy frecuentes en los roedores del desierto (jerbo, ratón, etc.).

Simitch hace defecar las ratas en líquido de Ringer: deben obtenerse excrementos blandos. De esta forma se obtienen *Trichomonas, Chilomastix, Octomitus, Giardia.*

El *Bodo lacertoe* es frecuente en las lagartijas de Europa (obsérvense los excrementos recién evacuados). Los renacuajos de ranas y sapos proporcionan un material muy rico en protozoos intestinales (Hegner).

La observación en fresco generalmente no presenta ninguna dificultad, dada la motilidad de estos microorganismos. Los quistes pueden ser difíciles de reconocer, pero la utilización del Lugol combinado con la tinción a base de tionina (ver p. 277) ofrecerán imágenes más nítidas del núcleo y de los flagelos. Goiffon ha señalado para la *Giardia intestinalis* del hombre la presencia de quistes aparentemente vacíos en los excrementos, homogéneos y teñidos de color *azul claro* con el Lugol.

La tinción vital también ofrece buenos resultados que permiten estudiar los quistes convenientemente teñidos.

M. J. Hogue aconseja el empleo del verde Janus B. Se coge una gota de solución al 0,5 % diluida en diez o veinte gotas de agua. Este colorante pone en evidencia los flagelos.

La observación de estos parásitos en campo oscuro permite facilitar la observación de los flagelos, el poder contabilizarlos, así como apreciar mejor sus movimientos.

Para hacer los frotis húmedos se procede como en el caso de las amebas. Si el producto es excesivamente espeso se eluirá sobre el portaobjetos con un poco de solución fisiológica tibia y así se elimina rápidamente el gran acúmulo al inclinar el portaobjetos. Se procede a hacer la extensión y se fija, en húmedo, con el líquido de Duboscq-Brasil.

Dada la delicadeza de estos microorganismos se debe evitar manipularlos excesivamente y sólo hay que trabajar con material fresco, dado que las formas no enquistadas desaparecen rápidamente. En el caso de poder hacer la observación de inmediato, deben conservarse los materiales en la nevera o al fresco, nunca en la estufa. Evidentemente que los quistes son más resistentes.

Para *teñir flagelos*, Hollande recomienda completar la tinción empleando la eosina, procediendo de la siguiente manera. El material debe haberse fijado con el Bouin-Hollande. Tras diferenciación en alumbre férrico y lavado se hará una sobretinción con eosina al 1 % (durante 12 a 24 horas); lavar con agua destilada y teñir posteriormente los flagelos con el ácido fosfomolíbdico al 1 % durante cinco a diez minutos; lavar con agua corriente y hacer una tinción de contraste con el verde luz al 0,50 %, siendo el tiempo de actuación del colorante de treinta segundos a un minuto. Diferenciar con alcohol de 95 %, bajo el microscopio, frenar la regresión con alcohol amílico; pasar por xilol y montar con bálsamo o equivalente.

R. M. Cole y M. F. Day han aconsejado la utilización de impregnaciones argénticas, y de manera preferencial el *protargol* activado de Bodian. El aparato parabasal se pondría muy bien de manifiesto, así como los flagelos y las membranas ondulantes. En caso de no hacer el método del protargol puede utilizarse la técnica de Holmes, especial para aplicar sobre cortes.

Los materiales humanos que contienen quistes de flagelados se conservan muy bien en formol al 5 %, tras dilución y tamizado previo.

Para el estudio de *flagelados del tubo digestivo de los artrópodos* debe aislarse este tubo digestivo por las técnicas de disección indicadas más adelante; su contenido se extiende y se obtienen frotis secos o húmedos que se teñirán con el Romanovsky (método panóptico). Debemos señalar que el melófago de la oveja *(Melophagus ovinus)* es un material muy cómodo para poder estudiar *Crithidia (Crithidia melophagia).* Basta con cortar la parte posterior del abdomen del insecto, apretarlo suavemente entre el índice y el pulgar para extraer una gota de líquido sanguinolento que se extenderá sobre un portaobjetos; se dejará secar y se procederá a su tinción. Generalmente, los *Crithidia* son muy abundantes.

Ll. Lloyd y W. B. Johnson han descrito minuciosamente sus métodos de estudio de los *Tripanosomas en las glosinas.* Debe apretarse el extremo de la trompa de la mosca, entre el pulgar y el índice a fin de provocar la salida de una gota de saliva, haciendo una especie de masaje de atrás hacia adelante, de manera que se distienda la delgada película que hay en la base de la trompa. Mantener la cabeza hacia adelante, con ayuda de un alfiler y recoger la gota sobre un portaobjetos, seguidamente proceder a su extensión. De esta manera pueden depositarse sobre un mismo portaobjetos varias gotas de saliva. Los flagelados de las glándulas salivales y del tubo digestivo serán localizados disociando dichos órganos en suero fisiológico al 0,7 % o mejor todavía en suero fresco de gallina.

Se extiende, se deja secar al aire, a continuación se procede a su fijación y finalmente se tiñe, es decir, debe procesarse como si se tratara de una extensión de sangre.

B. — *FLAGELADOS SANGUÍCOLAS*

Consideramos en este grupo los tripanosomas, los tripanoplasmas y por cuestiones de tipo técnico también incluiremos en este grupo las *Leishmania.*

Material de estudio. — Para los tripanosomas debe buscarse en la rana el *T. rotatorium;* en la rata de campo el *T. lewisi;* en la anguila el *T. granulosum*. También puede recurrirse a un laboratorio para obtener un ratón inoculado con un tripanosoma como el *T. brucei*. De esta manera obtendremos extensiones muy ricas en parásitos, pero únicamente se podrá conservar el virus mediante inoculaciones sucesivas y próximas (cada cuatro o cinco días). Para los tripanoplasmas deberá recurrirse a la tenca; pero dado que los peces son bastante difíciles de manipular recomendamos buscar caracoles (*Trypanoplasma helicis* Leidy), siempre muy abundantes en el receptáculo seminal. Al iniciarse el período de hibernación se encuentran sin embargo formas aflageladas. Este parásito no sólo existe en el *Helix pomatia,* se encuentra también en bastantes gasterópodos pulmonados.

Los peces marinos proporcionan excelentes materiales para el estudio de flagelados sanguíneos. Se hace una extracción de sangre, bien sea de las branquias, con el extremo de una micropipeta, o bien picando la cola del animal, o por punción directa al corazón, con o sin abertura previa de la pared cardíaca. La punción cardíaca es el mejor método para obtener sangre en cantidad suficiente y no mezclada con agua. En la página 279 (ver «Técnica hematológica») se hallarán descritas las mejores técnicas para la obtención de sangre de diversos animales.

Tripanosomas y tripanoplasmas

Observación en fresco. — El examen de estos microorganismos *en fresco* es algo más complicado. Se extrae una gota de sangre del animal de experimentación y se observa entre porta y cubreobjeto. La gota no debe ser demasiado gruesa, dado que si es un poco gruesa no podrán observarse apenas los tripanosomas. En una buena preparación, los hematíes deben formar una sola capa y estar ligeramente separados entre sí. Obsérvese con un objetivo en seco, bastan unos 500 aumentos.

Se reconocen inmediatamente los tripanosomas por sus clásicos movimientos y por el desplazamiento que provocan a los hematíes. A fin de poder hacer observaciones un poco largas deberá cementarse la preparación con parafina fundida, a fin de evitar la evaporación y consiguiente desecación. Una vez tomada esta precaución durante largo tiempo podrán seguirse las evoluciones de los tripanosomas.

La *microfluoroscopia* puede facilitar enormemente la localización de los tripanosomas cuando se encuentran en número escaso. Como fluorocromo se emplea la corifosfina al 1/15 000, dejando actuar de cinco a diez minutos: el flagelo es verdoso, mientras que el citoplasma, el núcleo y el blefaroplasto presentan una fluorescencia amarillo-anaranjada. Puede hacerse este tipo de observación tanto en extensiones como en fresco, los tripanosomas se mantienen vivos y los hematíes no presentan fluorescencia.

Las *tinciones vitales* no aportan gran cosa, por lo que no las recomendamos. Únicamente el rojo neutro tiñe algunas granulaciones citoplasmáticas.

El *método de tinción-lacado con el azul de metileno,* siguiendo el protocolo de M. Simons o de R. Suter (p. 281), por el contrario, ofrece excelentes resultados.

Con respecto al *Trypanosoma lewisi* debemos hacer dos observaciones sentadas por C. Biot: los parásitos se conservan vivos durante bastantes días (hasta seis o siete días) en el hígado del animal *no abierto* y colocado en la nevera; pueden reanimarse con la ayuda de solución fisiológica introducida a la sangre extraída del hígado por trituración previa.

Yorke, Adams y Murgatroyd han observado que los sueros de conejo, de oveja, de buey, de caballo y de cerdo pueden conservar los tripanosomas vivos al menos durante veinticuatro horas a 37°. El suero humano, por el contrario, es altamente tóxico, salvo para *T. gambiense*. No debe haber más de mil tripanosomas por milímetro cúbico, un número superior determina una disminución demasiado rápida de glucosa, *alimento esencial* para los tripanosomas.

Método de diagnóstico. Frotis desecados. — Se obtienen los frotis siguiendo la técnica anteriormente mencionada (ver más adelante) y desecados lo más rápidamente posible. A continuación, se tiñen con cualquier derivado del Romanovsky. Particularmente, aconsejamos los métodos panópticos y pancrómicos.

El método de estudio de las extensiones secas es perfectamente suficiente para los trabajos rutinarios y siempre ofrece excelentes preparaciones.

Si se quieren emplear técnicas citológicas, se fijarán las extensiones húmedas y se teñirán, bien sea con la hematoxilina férrica, o bien con el Romanovsky en el caso de las extensiones húmedas.

Tinción de las formas cultivadas de flagelados. Se obtienen suficientes preparaciones efectuando frotis desecados a partir de un líquido condensado que contiene numerosos tripanosomas, o bien con fragmentos de gelosa cogidos del fondo de un tubo de cultivo, cuando todo el líquido se ha evaporado. Se tiñe con un método panóptico.

Sin embargo, con este sencillo método en ocasiones no obtenemos resultados óptimos, los flagelados se tiñen mal o incluso pueden no colorearse y el fondo de la preparación queda cubierto de finas granulaciones. Los procedentes de suero permiten mejorar la técnica.

Ponselle fija las extensiones bien secas virtiendo sobre la película una gran gota de la mezcla siguiente:

Alcohol absoluto: 50 ml + tintura de yodo al 10 %: 10 gotas.

Dejar actuar durante cinco minutos, después lavar con alcohol y dejar secar.

Seguidamente verter unas cuantas gotas de cualquier suero, de manera que la extensión quede totalmente cubierta. Escurrir y dejar secar y después teñir con el Giemsa.

W. Nöller fija las extensiones húmedas con el sublimado concentrado en caliente. Lavar abundantemente con agua, y después con la solución fisiológica y finalmente introducir la preparación durante cinco a quince minutos en cualquier suero, fresco y estéril. Escurrir, dejar secar, y fijar como mínimo durante diez minutos con alcohol absoluto. Teñir con el panóptico y diferenciar rápidamente en el suero, tras un corto lavado con agua.

Parrot y Lestoquard fijan con sublimado alcohólico de Schaudinn, lavan con alcohol yodado y después con alcohol de 95° y dejan secar. Seguidamente recubren las extensiones son suero de caballo, escurren rápidamente y tiñen con Giemsa.

Lestoquard añade al Giemsa una décima parte de suero de caballo. Verter gota a gota el colorante sobre el suero, agitando suavemente. Dejar reposar durante una semana, después teñir durante una hora con una dilución de la mezcla colorante-suero en una décima parte de agua destilada neutralizada. Fijar con antelación durante diez minutos con alcohol yodado (2 % de tintura de yodo) lavar con alcohol y dejar secar.

Conservación de los tripanosomas y de las espiroquetas. — E. Ivanoff ideó un ingenioso sistema para conservar viables los tripanosomas y las espiroquetas. Consiste en inyectar con estos virus orugas de *Galleria melonella:* se conservan bien durante cinco a siete días y de esta manera pueden transportarse a temperatura ambiente y hacer un largo viaje.

Observación de la sangre periférica en estado fresco. — Se extraerá la sangre del dedo o del pulpejo de la oreja; en caso de haber eritemas circulares, preferentemente se extraerá de este nivel. Observar entre porta y cubreobjetos, cementando con vaselina o con parafina fundida para evitar la desecación de la gota. Recorrer metódicamente la preparación con ayuda de un carro móvil aplicado sobre la platina del microscopio. Hacer varias preparaciones.

Si este medio escasea, hacer un buen número de *frotis*, al menos una docena. Fijar y teñir con el método de Romanovsky (panóptico o pancrómico). En ocasiones se observa un tripanosoma después de haber explorado minuciosamente de 15 a 20 preparaciones sin éxito.

Estos procedimientos anticuados deben sustituirse por el método de la tinción-lacada con azul de metileno a fin de poder establecer un diagnóstico; puede seguirse la metodología propuesta por H. Simons o la de R. Suter (ver p. 281). Los tripanosomas (inclusive *T. cruzi*) aparecen como pequeñas serpientes azuladas a pequeños aumentos, dos o tres veces más largas que el diámetro de los leucocitos. Dado que no están deformados por la técnica de preparación seguida, puede apreciarse muy bien su contorno, su núcleo (vesícula clara que contiene un nucléolo intensamente teñido en rojo), su flagelo y su membrana ondulante (no teñida y enrollada alrededor del citoplasma azulado).

En caso de duda siempre puede optarse por trabajar a mayor aumento, con una combinación ocular-objetivo en seco, más fuerte.

Lundie ha dado a conocer un procedimiento que da resultados interesantes para las *tripanosomiasis animales*. Debe procederse de la siguiente manera: recoger sangre en un tubo de ensayo estéril, conteniendo 5 g de citrato potásico disuelto en 5 ml de agua destilada, totalmente esterilizada. Llenar las tres cuartas partes con sangre y hacer girar el tubo entre las manos, a fin de que se mezclen bien las distintas soluciones, dejar reposar. A los treinta minutos, aproximadamente, por encima de la sangre se forma una capa clara en la que se agruparán todos los tripanosomas. Obsérvese una gota extraída de esta capa y en el caso de existir parásitos habrán quedado muy bien conservados.

Triple centrifugación. — Método de Martin y Leboeuf. — 1.°) Extraer 10 ml de sangre de una vena del codo y mezclarla inmediatamente con un volumen igual de solución de citrato sódico al 1 %.

2.°) Centrifugar tres veces consecutivas, girando a la velocidad de 65 revoluciones por minuto, lo que equivale a unas 1500 vueltas de la centrífuga de mano de Krauss.

a) Girar durante siete a diez minutos hasta que la sangre quede bien separada en dos capas.

b) Decantar el plasma, y centrifugarlo nuevamente durante diez minutos. En el sedimento encontramos: eritrocitos, microfilarias, en caso de que el enfermo sea un portador, y algunos tripanosomas.

c) Decantar una vez más el sobrenadante y nuevamente centrifugar durante veinte minutos. El sedimento contiene unos escasos leucocitos, algunos hematíes, se encuentran también hemocitoblastos, generalmente irreconocibles, algunas microfilarias y tripanosomas.

Precipitación-centrifugación química de Simon. El principio en que se basa este método consiste en arrastrar los parásitos en un precipitado químico pesado, separar este último por centrifugación y después redisolverlo químicamente, con lo que quedan nuevamente en libertad los parásitos. Los procedimientos utilizados en bacteriología (Vallet, 1901; Nembel, 1902; Janssen, 1935) son demasiado fuertes y bruscos para poder aplicarlos en el estudio de los protozoos. Simons ha reconocido como uno de los más favorables el que interviene por el sulfato de cobre y el hidróxido de zinc [$Zn(OH)_2$] y que los mejores disolventes para la liberación de los parásitos son el ácido acético y sobre todo el amonio amoniacal.

Reactivos. — Son ocho y de una conservación ilimitada los números 3, 4, 6, 7, 8 que deben guardarse en frascos esmerilados; los números 5-8 deben mantenerse a la oscuridad.

1) *Sulfato de cobre* al 10 % en agua destilada.

2) *Sulfato de zinc* N/1 (14,4 % en agua destilada), únicamente debe usarse para la orina.

3) *Amoníaco* comercial al 25 % (d = 0,91).

4) *Solución amoniacal* N/1 únicamente *para la orina.*

5) *Formol* comercial, al 40 % en frasco cuentagotas.

6) *Citrato amónico-amoniacal:* regar con agua destilada 50 g de ácido cítrico puro, cristalizado, y disolverlo lentamente, enfriando y agitando, en 175 ml de la solución núm. 3. Tras disolución y enfriamiento, completar hasta 1 litro con agua destilada. Filtrar si es conveniente.

7) Mezclar 10 centímetros cúbicos de solución núm. 6 con 2 ml de azul de Thedan T3 o de azul de Suter-Geigy.

8) Mezclar volúmenes iguales de la solución núm. 6 y ácido acético al 50 % de agua destilada. *Únicamente para la orina.*

Generalidades. — Centrifugar de sesenta a setenta minutos a 3100-3500 revoluciones, en tubos de fondo redondo de 10 centímetros cúbicos y de 15 milímetros de diámetro. Medir el líquido con una pipeta graduada. Los tubos de centrífuga, graduados en 1/10 centímetros cúbicos, permiten también leer el volumen del sedimento.

La formación del precipitado debe ser inmediata, para que todos los parásitos puedan ser englobados (método del trasvasamiento brusco).

Debe disponerse también de *dos asas:* una pequeña de 1,5 a 2 milímetros de diámetro interior; una grande de hilo de nicrón y que tenga de 3 milímetros a 3,5 milímetros de diámetro interno.

Líquido cefalorraquídeo. — 1) Se añaden 5 centímetros cúbicos en un tubo de centrífuga que tiene cinco gotas de formol para matar y endurecer los parásitos. Mézclese bien con una varilla de vidrio y dejar reposar durante unos minutos.

2) Verter con una pipeta graduada 1 ml de sulfato de cobre núm. 1 (medida exacta) en un vaso de precipitados de 100 ml. Procurar que únicamente quede mojado el fondo.

3) *Trasvase brusco.* — Mantener el vaso de precipitados totalmente vertical con la mano derecha y hacerle describir dos círculos de manera muy lenta. Con la mano izquierda se sostiene el tubo de la centrífuga y *bruscamente se vierte todo* su contenido en el vaso de precipitados. Acelerar un poco el movimiento rotacional impulsado al vaso de precipitados y mantenerlo sin parar durante sesenta a setenta segundos.

El precipitado obtenido, formado por un complejo de sulfato de cobre y de albúmina, se vierte dentro del tubo sin lavarlo. Para evitar al máximo que la pared se moje debe mantenerse el tubo de la centrífuga totalmente vertical o bien ayudarse a verter su contenido con una varilla de vidrio.

4) *Centrifugar* a 3000 revoluciones durante cuatro o cinco minutos (el sedimento debe medir de 0,2 a 0,4 ml). Aspirar el líquido sobrenadante con una pipeta muy delgada.

5) *Verter* en el centro de un portaobjetos 3 o 4 asas grandes de disolvente núm. 7 para el estudio de los tripanosomas y las espiroquetas sanguícolas, los números 6 o 7 para las leptospiras. Mézclese bien.

6) Flamear el asa y sacar 1 a 2 asas de sedimento que se depositarán sobre el portaobjetos. Mézclese bien con el disolvente. Si el líquido no queda aclarado en algunos segundos, debido a la formación de un complejo salino cobre-citrato, se añadirá un asa del disolvente y se mezclará nuevamente.

7) Colocar el cubreobjetos y obsérvese:

a) *Tripanosomas:* sobre fondo claro y trabajando de 80 a 120 aumentos, en seco. Si la tinción azul es excesivamente pálida, añadir una pequeña asa de T3 o de azul de Suter-Geigy.

b) *Espiroquetas sanguícolas:* se debe trabajar con los mismos aumentos anteriormente mencionados, preferentemente obsérvese en campo oscuro, que debido al efecto Berek, permite un diagnóstico mucho más seguro.

c) *Leptospiras:* el efecto Berek es generalmente muy débil o puede faltar, sobre todo cuando se ha utilizado el disolvente núm. 6 que no contiene azul de metileno.

Para precisar un diagnóstico dudoso deben emplearse combinaciones ópticas que ofrezcan de 350 a 700 aumentos; siempre se trabaja en seco.

Sangre. — El nivel de albúmina de la sangre es 400 veces más elevado que el del líquido cefalorraquídeo, por lo que habrá que modificar sensiblemente la técnica.

1) *Centrifugar* como mínimo a 3000 revoluciones, durante ocho a diez minutos, 10 ml de sangre tratada con ácido cítrico (9 partes de sangre, 1 parte de citrato de sodio al 4 % en agua destilada).

2) Aspirar con la pipeta el líquido claro hasta las proximidades de la zona clara, la zona leucocitaria y transportarla a una probeta graduada.

3) Extraer con una pipeta capilar una gota de la capa leucocitaria, depositarla sobre un portaobjetos y mezclarla con un asa pequeña de T5 o de azul de Suter-Geigy. Obsérvese.

4) Si la observación es negativa, extraer nuevamente otras dos gotas que se depositarán sobre el portaobjetos.

5) Si esta nueva observación resulta negativa, pasar a examinar el líquido que está en la probeta graduada. Diluir con un volumen igual de suero fisiológico, añadir 2 gotas de formol; mézclese con un agitador, dejar reposar dos minutos y centrifugar 5 minutos.

6) *Trasvase brusco,* como en el caso anterior, pero tomar sólo 0,3 a 0,8 ml de la solución núm. 1 (sulfato de cobre). Después de someter el material a 3000 revoluciones durante tres minutos deben obtenerse de 1,8 a 2,1 ml de sedimento. Centrifugar todavía durante siete a ocho minutos para compactar más el sedimento y terminar como en el caso anterior.

7) También puede observarse el sedimento rojo de la primera centrifugación con el T5 o el azul de Suter-Geigy.

Punción ganglionar. — Puncionar con ayuda de una pequeña jeringa los ganglios cervicales hipertrofiados. La observación de la gota así obtenida y procesada siguiendo el método de la *tinción-lacado de azul de metileno,* permitirá observar los tripanosomas con suma nitidez. En caso de no acceder a los ganglios cervicales puede hacerse la punción en los ganglios submaxilares o en los inguinales. El jugo ganglionar aspirado y cuanto menos mejor concentrado (eluir con suero fisiológico) es triturado con 2 o 3 asas de colorante (T3 de Simons o azul de Geigy-Suter) de forma que la mezcla quede azul. Los parásitos son extremadamente visibles al observar la gota espesa.

C. Albahary ha publicado un estudio en el que se especifican todas las indicaciones técnicas y metodológicas, así como los resultados de la *punción ganglionar*. Emplear una agua de bisel corto, o mejor de bisel afilado en su periferia, con taladro bien adaptado y una jeringa a 30 a 40 ml. Picar dos veces, primero los tegumentos y después el ganglio, éste lo hemos inmovilizado cogiéndolo entre el índice y el pulgar, a fin de obener una máxima cantidad de serosidad y a ser posible nada de sangre. Tirar unas cuantas gotas de serosidad sobre los portaobjetos totalmente limpios. Teñir con el May-Grünwald Giemsa. De esta manera, puede obtenerse un *adenograma.* Este método da óptimos resultados no sólo para el estudio de las *tripanosomiasis,* sino también para el diagnóstico de la enfermedad de Hodgkin, los sarcomas ganglionares, las adenopatías tuberculosas o los satélites del chancro sifilítico.

Punción lumbar. — Se extraen 10 ml de líquido cefalorraquídeo siguiendo la técnica habitual. Se centrifuga una única vez, durante diez minutos y se observa el sedimento en fresco y en extensiones teñidas.

El *método de la tinción-lacada con el azul de metileno* ofrece una vez más los mejores resultados. A 5 centímetros cúbicos del líquido cefalorraquídeo se le añaden quince gotas del colorante (T3 de Simons o azul de Geigy-Suter). Los parásitos quedan inmediatamente muertos y la centrifugación es mucho más fiable que la llevada a cabo *in vivo*. Centrifugar durante quince a veinte minutos; extraer con la pipeta el líquido claro sobrenadante y hacer con el sedimento varias preparaciones cuanto más gruesas mejor (gotas líquidas espesas).

Punción medular. — Según L. C. Brumpt no puede todavía ser suplantada por cualquiera de las otras punciones estudiadas debido a que la punción medular aporta datos valiosísimos para establecer el diagnóstico. Aparte de esto es más sencilla de efectuarse y más rápida que la triple centrifugación. Asimismo es más fácil de hacer y menos dolorosa que la punción lumbar, pero no tiene su valor en el pronóstico como la anterior.

Hemocultivo. — En casos extremadamente difíciles, P. Brutsaert y C. Henrard (1938) llegaron a hacer el diagnóstico mediante un procedimiento especial de hemocultivo. El medio está formado por el líquido de Ringer con un 0,6 % de ClNa al que se le ha añadido sangre humana citratada al 1 % (2 ml de esta sangre por 2 o 2 ml de Ringer por tubo). Extraer 5 centímetros cúbicos de sangre venosa a nivel del codo, con una jeringa cargada de 1 ml de *líquido de Roche* al 1 % (polianetosulfonato sódico) previamente esterilizado en ampollas. La sangre, mezclada con el alícuata, es distribuida en diez tubos, a razón de 1 ml por tubo. Ponerlos a la estufa a 25-28°. Examinarlos a partir del décimo día para ver si hay tripanosomas, en caso de haberlos se visualizan entre el décimo al vigésimo día. A fin de mantener la cepa conviene resembrar cada diez días. El líquido de Roche se ha revelado mucho más interesante que el citrato de sodio para las extracciones de sangre.

Inoculación experimental. — Cuando todos estos sistemas han fracasado debe intentarse una

vez más, inoculando animales sensibles. El animal escogido, siempre y cuando se trate de un ejemplar receptivo, es el mono. El más sensible de todos es el mono pata *(Cercorithecus ruber)*, en el que la evolución de la enfermedad se lleva a cabo con suma rapidez; generalmente muere al cabo de tres semanas (Brumpt y Würtz, Thiroux). Este mono es muy abundante en África, por lo que puede utilizarse en su lugar de origen para el diagnóstico o para los ensayos de infestación por las glosinas.

Dourina

Diagnóstico experimental de la dourina. — Soldini extrae, mediante punción séptica con lanceta, líquido del edema de la piel o del escroto. Debe procederse con extremada rapidez dado que la coagulación es muy rápida. Inocular con la jeringa medio mililitro en cada testículo del conejo. Al cabo de cuatro o cinco días, debe puncionarse el edema escrotal y examinar al microscopio la serosidad en fresco: generalmente hay numerosos tripanosomas.

C. — *DIAGNÓSTICO DE LAS LEISHMANIOSIS*

Este diagnóstico se basa en la observación del parásito en extensiones y en la obtención de cultivos que contienen formas flageladas características.

Trepanación del fémur o de la tibia en el perro. Manceaux puso a punto una técnica muy elegante para hacer el diagnóstico del kala-azar en el perro, para su examen en la médula ósea donde los parásitos son muy numerosos, frecuentemente mucho más abundantes que en el bazo. Escoger un punto de la piel, procurando que no sea demasiado blando a fin de no tener que atravesar demasiadas partes blandas; afeitarlo, aplicar una capa de tintura de yodo y trepanar el hueso con un pequeño taladro, previamente esterilizado. Trepanar suavemente y parar en el momento en que su punta haya alcanzado un conducto diafisario. Al retirar el taladro se extrae suficiente cantidad de médula para hacer una o dos extensiones.

Examen de la piel y de las uñas. — F. Lestoquard y A. Donatien, aprovechando la gran riqueza de *Leishmania* en la piel llevan a cabo su diagnóstico en el perro, haciendo una *extensión de la biopsia dérmica* obtenida con una pinza tipo fórceps, cuyas ramas están recubiertas de caucho. Basta con cortar rápidamente la extremidad de un pliegue con tijeras bien afiladas y hacer unas cuantas extensiones por aposición del material directamente de la herida abierta.

Fijar con alcohol yodado (con un 2 % de tintura de yodo), lavar con alcohol de 95° y dejar secar. Teñir durante 45 a 60 minutos con la solución: 1 ml de agua destilada no neutralizada (ácida) con tres gotas de Giemsa rápido y tres gotas de May-Grünwald. Lavar y dejar secar.

F. Lestoquard y A. Donatien se dieron cuenta enseguida de que en el transcurso de la leishmianosis canina los parásitos están constantemente presentes en el epitelio subuñal de los perros enfermos. Por lo que encontraron en esta zona un precioso material para su diagnóstico. La extracción de la muestra, a nivel de la matriz de la uña, debe efectuarse de tal manera que se obtenga la máxima cantidad de serosidades exentas de sangre. Cortar la uña con fuertes tijeras o con pequeños alicates, o con una pequeña sierra. Operar lentamente hasta llegar a la terminación de la matriz, en la cumbre inguinal. Se extiende la serosidad sobre los portaobjetos y se procede a la tinción rutinaria.

Inoculaciones experimentales. — Preferentemente, se hacen junto con los cultivos. Aparte del perro, inicialmente empleado con esta finalidad, los mejores animales para la conservación del virus son el hámster *(Cricetulus griseus)* y el espermófilo *(Citellus citellus)*. Este último abunda en Macedonia; vive muy bien en cautividad.

CILIADOS

Es sumamente fácil consegir ciliados: las aguas estancadas, las infusiones y maceraciones de restos vegetales (heno, paja, hojas, estiércol de caballo, etc.) encierran innumerables ejemplares de diversas especies. Lo que ya resulta más difícil es obtener un cultivo puro de una única especie. El sistema más seguro es evidentemente el de sembrar, con un solo ejemplar de la especie que nos interese, la infusión nutritiva previamente esterilizada. Se consigue con un poco de paciencia, sobre todo cuando se trata de grandes especies. Se deben ir obteniendo diluciones sucesivas. Cada vez que se hace una elución con una pipeta se extrae un poco de agua y se observa al microscopio, hasta que finalmente se consigue una muestra con un único infusorio.

La utilización del micromanipulador facilita extraordinariamente estas operaciones.

C. W. Rees utiliza para el microaislamiento bajo el microscopio una pipeta especialmente diseñada para ello; cada uno puede construirse la suya. Está formada por dos fragmentos de tubo de pipeta ordinaria de 5 centímetros de longitud, unidos por un tubo de caucho de diámetro adecuado y de 3 centímetros de largo. Uno de los tubos de vidrio está cerrado a la llama por uno de sus extremos, el otro está sumamente afilado y acodado.

Describiremos la técnica indicada por Hertwig para conseguir paramecios. Se coge una almeja de río (anodonta), se tritura su pie y las branquias y se ponen los fragmentos en agua para que se pudran. Al cabo de algunos días se puede recoger con la pipeta multitud de paramecios que se encuentran asociados en la superficie del cristalizador donde ha tenido lugar la putrefacción de los órganos de la almeja. Se traslada en cristalizadores llenos de agua de estanque, rica en materia orgánica. En cada cristalizador se suspende, con la ayuda de un hilo, un saquito de gasa que contenga lechuga machacada; estas hojas deberán ser renovadas frecuentemente, con lo que se favorece el crecimiento de las bacterias que constituyen el alimento de los paramecios.

K. M. Hansen aísla los paramecios calentando a 37° durante una hora y media la infusión de heno donde se encuentran. Seguidamente, se cultivan en una infusión esterilizada a 120°, en la que se siembran bacterias de la infusión anterior.

El sistema de los *portaobjetos sumergidos*, ya mencionado para el estudio de las amebas, dio excelentes resultados a Fauré-Frémiet (1932) para la recogida y estudio de protozoos marinos, así como para los de agua dulce, sobre todo para los ciliados. Se colocan los portaobjetos en soportes con ranuras y los microorganismos acuden a ellos y los colonizan.

A. T. Henrici emprendió un año más tarde (1933) con éxito, y sin conocer las publicaciones de Fauré-Frémiet, el sistema de los portaobjetos sumergidos y lo utilizó para el estudio de bacterias de agua dulce. Ataba los portaobjetos sobre cables de hilo de cobre aislado.

Los portaobjetos quedaban colgando por medio de cinta adhesiva. Las líneas o cables, provistos de flotadores, estaban ancladas por pesos de más de un kilogramo.

Los ciliados parásitos se encuentran en el intestino de numerosos animales. El estómago de los rumiantes y el ciego del caballo proporcionan gran riqueza y variedad de ciliados, provistos de interesantes apéndices. Los ejemplares jóvenes de cerdo normalmente poseen *Balantidium coli*, si bien no se encuentran en todos los ejemplares estudiados. En este sentido es más cómodo trabajar con batracios; en casi todas las ranas del sur de Europa se encuentran abundantemente: *Opalina ranarum, Balantidium entozoon* y *Nyctotherus cordiformis;* se trata de un excelente material para hacer estudios de ciliados. En otros batracios se encontrarán otras especies altamente interesantes. Metcalf señala principalmente la *Opalina intestinalis* y *Opalina caudata,* que se hallan en el recto de *Bombinator igneus* y de *B. pachypus* y que únicamente poseen dos masas nucleares. Estas mismas especies presentan algunas variedades, encontrándose en grandes cantidades en *Bufo calamita* y en *Discoglossus pictus* (Brumpt).

Observación en fresco. — Se extraen con una pipeta fina de los medios naturales y de los cultivos. Se encuentran multitud de ciliados parásitos de mamíferos al estudiar sus excrementos. Para el estudio de bacterias, en caso de no querer sacrificar el animal y abrir su intestino, deberá introducirse en el recto una pipeta blanda de calibre deseado. En el caso de no haber líquido, hacer un lavado previo con algunas gotas de suero fisiológico, a fin de eluir el contenido rectal y provocar la salida de los ciliados que viven formando masas en la superficie de la mucosa rectal.

Los ciliados se mantienen largo tiempo en vida en gota pendiente, cuando se ha tenido la precaución de cementar correctamente la preparación. Pero la rapidez de sus movimientos es un gran obstáculo cuando se hace una observación prolongada. Se han propuesto numerosos sistemas para *lentificar estos movimientos*. Todos ellos se basan en la utilización de sustancias mucilaginosas que se añaden a los líquidos de cultivo o de observación. Brumpt utiliza simplemente la *saliva* desprovista de burbujas de aire. W. H. Krull ha recomendado el empleo de la clara de huevo pura como un excelente medio para lentificar los movimientos de las formas larvarias de los helmintos; este procedimiento también puede aplicarse en el estudio de los ciliados.

Metilcelulosa y alginatos. — Parece ser que actualmente el mejor medio utilizado sea la *metilcelulosa* y los *alginatos*, todos ellos muy solubles en agua y que dan un mucílago transparente y que no provoca precipitados sobre los microorganismos. Estos compuestos dan excelentes resultados para el estudio de los flagelos bacterianos o de los ciliados.

La metilcelulosa es un éter de la celulosa soluble en agua. Las soluciones son viscosas, incoloras, inodoras e insípidas no tóxicas. Hay seis tipos de viscosidad, de 15 a 4000 centipoises para soluciones del 2 %.

Para obtener una solución debe pesarse la cantidad deseada y tirarla en la mitad del volumen necesario de solución fisiológica hirviendo, dejar hinchar durante unos minutos y después completar con más solución fisiológica hasta obtener el volumen deseado. Guardar en la nevera en frasco herméticamente cerrado con tapón de corcho, hasta conseguir una total disolución, agitando el frasco de vez en cuando. La viscosidad *aumenta* al elevar la temperatura. Las soluciones preparadas estérilmente se conservan largo tiempo en la nevera.

Statkewitsch efectuó un estudio exhaustivo de los mucílagos que mejor convienen para el estudio de los ciliados. El movimiento de los cilios no debe ser alterado, en cuanto a la manera de llevarse a cabo, únicamente debe ser amortiguado, por la resistencia que le opone la consistencia del

medio en que se halla. El principio de Statkewitsch consiste en aumentar lenta y progresivamente esta consistencia por progresiva disolución de un gel coloidal.

Clasificaremos estas sustancias en dos grandes grupos: 1.º) mucocoloidales: caragahen, semillas de *Plantago psyllium*, de membrillo, goma de *Astragalus tragacanthus*, agar-agar; 2.º) proteocoloides (gelatina, albúmina, almidón, dextrina). Son las de primer grupo que se prestan mejor a la obtención de líquidos de distinta consistencia, siempre que su mucílago se disuelva bien en agua fría y que no contengan sustancias tóxicas. Podemos distinguir tres grados de consistencia: líquido, tipo jarabe y coloidal.

Son las semillas de *Plantago psyllium* que proporcionan los mucílagos más delicados y los más transparentes. Se coloca una capa de 1 a 2 centímetros de estas semillas en el fondo de un ancho cristalizador y seguidamente se vierte encima de 5 a 10 ml de medio de cultivo rico en ciliados.

El caragahen *(Fucus crispus)* permite obtener fácilmente los tres tipos de consistencia; asimismo, esta alga se presta a hacer cualquier tipo de estudio, pero debe tomarse la precaución de lavarla previamente a cualquier otra manipulación, con carbonato de sodio al 0,5 o al 1 %. Puede utilizarse para espesar todo el medio de cultivo, para lo cual basta con poner unas briznas en el líquido, que se retiran al cabo de cuatro o cinco días, según la consistencia que deseemos; por otro lado, al cabo de este tiempo el mucílago empieza a descomponerse y da al medio una reacción ácida. Esto puede evitarse al añadir algunos centímetros cúbicos de carbonato sódico al 1 %. También puede colgarse el alga en pequeñas bolsas (4 al 6 % del cultivo). En tres días el líquido ha alcanzado la consistencia deseada. Pero todavía puede obtenerse un medio más espeso haciéndolo evaporar en un vidrio de reloj o dejando una pequeña cantidad sobre el portaobjetos.

Algunas especies, sobre todo los paramecios, terminan por degenerar en este medio que es entonces invadido por *Colpidium colpoda* y por *Colpoda cucullus*, que pueden vivir largo tiempo en medios muy consistentes. La desaparición de los paramecios puede evitarse lavando el cultivo con agua fresca, después de tres o cuatro semanas, pero teniendo la precaución de mantener el nivel exacto del líquido por el sistema que indicaremos más adelante. Al cabo de tres días, se colocan nuevas ramitas de *Fucus*, y renovando varias veces y periódicamente estas operaciones se puede conservar durante varios meses el cultivo de paramecios.

Si se teme estropear un cultivo altamente interesante deberá procederse con sumo cuidado y densificar sólo una pequeña parte de dicho cultivo en un recipiente de dimensiones reducidas, manteniendo el cultivo primitivo intacto.

Las semillas de membrillo dan una considerable cantidad de mucílago, deben emplearse en la proporción de 1 gramo por 50 cc de agua. Permiten preparar rápidamente un medio muy consistente. La goma de astrágalo (goma de adraganto) se emplea más diluida: se colocan de 2 a 5 decigramos en el fondo del cristalizador donde se tiene el cultivo. El medio se vuelve también rápidamente espeso. La goma de cerezo y la goma arábiga se disuelven muy lentamente y no dan resultados tan satisfactorios.

El agar se disuelve bien en caliente, pero muy lentamente en frío. También conviene en el caso de los cultivos puros, que se tienen en recipientes altos y estrechos (para evitar la excesiva evaporación). Se colocan de 100 a 2000 ml de agua, de 3 a 7 gramos de agar en fragmentos de 8 a 10 centímetros de superficie y trazas de carbonato sódico y de fosfato cálcico. Dos o tres días después se siembran los ciliados que se desarrollarán lentamente en dicho medio. El líquido no adquiere una determinada consistencia hasta haber pasado unos tres o cuatro meses. Estos cultivos son muy adecuados para efectuar estudios del quimismo de estos microorganismos.

La gelatina recomendada por Ludloff es enérgicamente desaconsejada por Statkewitsch. Efectivamente, debe licuarse cada vez la película de gelatina y nunca llega a mezclarse bien con el medio de cultivo. Por otro lado, los ciliados se deforman y sus movimientos quedan sensiblemente alterados. En lo que respecta a los geles de albúmina, de almidón o de dextrina, los ciliados no los toleran debido a la rápida descomposición de estas sustancias.

En determinados casos puede ser interesante el estudio del *movimiento de los cilios* en suspensiones tintoriales (carmín de índigo, carbón porfirizado, polvo de licopodio, etc.). El volumen de las semillas deberá ser proporcional al tamaño de los ciliados. El procedimiento de la tinta China, aplicado en fresco, sin previa desecación, podrá ofrecer grandes posibilidades de estudio. Pero todos estos medios señalan únicamente las turbulencias debidas al movimiento de los cilios y no a los propios cilios.

Las tinciones vitales tienen una importancia capital para el estudio de los ciliados. El reactivo más seguro por ser el más inocuo es el rojo neutro que en ocasiones tiñe el núcleo, aunque éste se tiñe preferentemente con el azul de metileno y por el contrario éste no tiñe tan bien ciertas granulaciones citoplasmáticas que sí quedan bien contrastadas con el rojo neutro. El rojo neutro permite seguir los procesos de la digestión intravacuolar, dado que vira a color rojo cereza en presencia de contenidos vacuolares de tipo ácido y es de color rojo amarillento en presencia de sustancias alcalinas. El polvo de tornasol y el rojo

Congo también dan reacciones digestivas sumamente interesantes. Algunos autores han utilizado el cristal violeta, el violeta de metilo, el verde luz en soluciones del orden de 1 por 10 000 o del 1 por 100 000 para teñir los núcleos. Los azules intensos azulados y el C3B, así como el azul de difenilamina no son colorantes vacuolares, pero matan las bacterias tiñéndolas intensamente de color azul.

El ácido acético y el carmín acético de Semichon, aplicados sobre material fresco, ponen generalmente muy bien de manifiesto la estructura del citoplasma y del núcleo. La tinción obtenida con cualquiera de estos colorantes es de tipo temporal.

Fijación. — En este caso no se puede pensar en hacer extensiones desecadas, aunque en ocasiones también se pueden estudiar. La fijación debe hacerse bien sea entre porta y cubreobjetos o bien por el sistema de la extensión húmeda, o en masa, previa centrifugación.

Se han propuesto numerosos fijadores para conservar adecuadamente estos microorganismos. Debemos mencionar ante todo el tetraóxido de osmio en solución o en forma de vapores (es sumamente volátil), sin embargo da resultados poco fiables y poco constantes. La mayor parte de autores recomiendan el sublimado, principalmente el sublimado alcohólico de Schaudinn, pero según Brumpt y atendiendo a nuestra experiencia personal, el Bouin o el Duboscq-Brasil dan también excelentes resultados. Las especies muy contráctiles (vorticélidos) pueden ser fijadas por el *método de la anestesia debajo del cubreobjetos,* diseñado por Certes y Beauchamp. Los microorganismos se colocan en una gota de agua, entre porta y cubreobjetos; la preparación se coloca sobre los dos soportes en una caja de vidrio que contiene un poco de alcohol, de cloroformo o de cualquier otro agente anestesiante volátil. Debe observarse detenidamente y cuando los movimientos han cesado debe introducirse rápidamente el fijador debajo del cubreobjetos.

Es cierto que el *formol* solo, en solución al 5 % da excelentes resultados. Los ciliados se conservan en él con el mismo aspecto que tenían en vida. Iluminando adecuadamente pueden estudiarse directamente sin necesidad de teñir. Este procedimiento es altamente interesante dado que permite conservar *in toto*, simplemente añadiendo agua formolada, el contenido intestinal de un animal parasitado o el producto de un medio de cultivo.

Cuando se dispone de material fresco que se estudia de forma continuada y rutinaria es preferible utilizar el formol ligeramente picricado. Con éste la fijación es todavía superior y la ligera tonalidad amarillenta que toman los microorganismos es muy favorable en el momento que se observen al microscopio. Brumpt utiliza preferentemente formol al 5 % al que añade un 10 % de líquido de Bouin; este líquido sirve simultáneamente como fijador y medio de conservación; debe cementarse la preparación con laca de Rondeau du Noyer o de Apathy.

Estudio. — Seguidamente indicaremos cuál es la mejor manera de proceder para estudiar y conservar los infusorios parásitos.

■ ESTUDIO CITOLÓGICO. — Sobre extensiones fijadas húmedas con el líquido de Bouin o con el de Duboscq-Brasil a base de sublimado alcohólico, o con el líquido de Flemming, etc., se procede a la tinción.

Para facilitar la adherencia de los ciliados al portaobjetos utilizar el *procedimiento de la saliva* recomendado por Brumpt o bien mezclar al producto a extender un poco de agua albuminosa o suero inactivado.

Puede fijarse en masa por centrifugación. Para observar las muestras fijadas sin que se mezclen, Metcalf, y también Mayer, recomiendan el empleo de cápsulas de gelatina formadas por dos tubos encajados (cápsulas Le Huby de Le Perdriel). Estas cápsulas son menos frágiles que los tubos de vidrio y evitan tener que utilizar el tapón de algodón, en el que parte del material puede perderse. Se cierra al colodión el cilindro interior de manera que su contenido no se deslice entre los dos cilindros y no quede aplastado. El conjunto se coloca en alcohol de 95° o de 90°, pero no en alcohol de 80°, que reblandece la gelatina.

■ ESTUDIO MORFOLÓGICO. — Depositar una gotita de líquido que contenga ciliados sobre un portaobjetos, añadir una gota de Bouin y extenderla según la técnica recomendada por Brumpt. Recubrir con el cubreobjetos y cementar la preparación. Antes de añadir el líquido fijador es interesante sacar, con ayuda de papel de filtro o papel secante, la mayor parte de agua, sin que los ciliados lleguen a secarse.

Otro procedimiento recomendado para el estudio de los ciliados es el de Bresslau, basado en el mismo principio que el método de la tinta China. Consiste en mezclar una gota de cultivo o de líquido con ciliados con una gota de *cyanochin* o mejor con una gota de azul de Prusia al 10 % solo o con cuatro a seis gotas de una solución al 6,5 % de *floxina* o de *rodamina*. Tener la precaución de calentar estas soluciones antes de usarlas a fin de redisolver el precipitado. Una vez efectuada la mezcla con el cultivo de ciliados, procédese a su extensión, secado y montaje con bálsamo o equivalente. También puede utilizarse la *nigrosina* al 10 %, aconsejado por Coles y por Deflandre (1923).

■ CONSERVACIÓN EN MASA en el formol al 5 o 10 % según la cantidad de agua que embebe los objetos.

■ EXTENSIONES EN LA GELOSA (Chatton y Lwoff, 1936). — Preparar una solución de gelosa al 1,3 % añadiéndole un 2,5 % de formol, como en el caso de la inclusión en gelosa y en parafina (ver en la p. 155: «Métodos de inclusión»). Esta gelosa funde hacia los 70° y se vuelve gelatinosa hacia los 45°.

Reunir en una pequeña gota de agua colocada sobre un portaobjetos, bien desengrasado, los materiales fijados, lavados y seleccionados. Hacer fundir un poco de gelosa, verterla sobre la gotita de líquido donde se hallan reunidos los materiales; el volumen de gelosa debe ser tres veces superior al volumen de esta gota. Mézclese bien y extender rápidamente sin que el material se deseque y dejarlo en la cámara húmeda hasta que la gelosa solidifique. Esperar a que coagule y conservar en alcohol de 70°.

Estas extensiones pueden ser lavadas, teñidas y montadas como si se tratara de un frotis corriente, siempre y cuando se trabaje en frío. La gelosa no retiene los colorantes básicos y apenas los colorantes ácidos.

Coloración. — El carmín y la hematoxilina son los mejores colorantes. Las soluciones tintoriales óptimas del carmín son el carmín clorhídrico y el carmín alumínico. La hematoxilina férrica es indispensable para el estudio del núcleo. Hay diversas opiniones que hacen referencia a la hematoxilina alumínica: muchos autores y, sobre todo Metcalf, desaconsejan el hemalumbre y recomiendan la hematoxilina de Delafield. Esta última solución únicamente es recomendada por su intensidad tintorial. Puede sustituirse ventajosamente por el glicemalumbre, que tiene una acción muy enérgica a la vez que su preparación y conservación es mucho más fácil. Añadiremos que el hemalumbre da excelentes resultados para teñir *Balantidium coli, B. entozoon, Nyctotherus cordiformis* y para distintas opalinas.

Sea cual fuere el método utilizado, generalmente debe hacerse una sobretinción de los ciliados y después diferenciarlos con alcohol clorhídrico muy diluido del 0,1 al 0,2 %, vigilar bajo el microscopio y detener su acción por un lavado en agua o mejor todavía con vapores de mercurio, según recomienda Metcalf, las opalinas deshidratadas y embebidas en aceite de cedro, antes de montarlas en bálsamo del Canadá. Para observar las grandes especies, fijadas y teñidas *in toto*, pueden ponérselas en aceite de cedro, en esencia de girasol o en terpineol, bajo un cubreobjetos ligeramente elevado por uno de sus lados con un pelo. Provocando ligeros desplazamientos de este cubreobjetos, se pueden hacer girar los ciliados y así pueden examinarse todas sus caras.

Como colorante de contraste se puede utilizar la eosina.

Cortes de ciliados. — Estos cortes son fáciles de obtener tras el método de la microinclusión con la gelosa y la parafina de Chatton (1923) y de Chatton y Lwoff (1930-1936). Ver en la página 155 el «Procedimiento de la doble inclusión en gelosa y parafina».

Tinción de cilios. — Los métodos de tinción que hemos indicado para los frotis y los cortes generalmente tiñen bien los cilios, sobre todo empleando un buen colorante citoplasmático. Según Waddington un buen método para poner de manifiesto los cilios de los ciliados (y sobre todo el de los paramecios) es el de añadir a la gota de agua que los contiene, una gota de tanino al 25 % en glicerina.

Impregnación argéntica. Métodos de Chatton y Lwoff

■ IMPREGNACIÓN TRAS LA INCLUSIÓN. — Chatton y A. Lwoff han empleado, para poner de manifiesto la infracialitura y las estrías argentófilas (gránulos basales y red de Klein), un método de impregnación argéntica que da resultados muy superiores a los del método de Klein por desecación.

Aislar o *reunir* los ciliados en una gota de agua sobre un portaobjetos bien desengrasado. Sacar el exceso de agua con la pipeta.

Fijar. — a) *Ciliados de agua dulce:* líquido de Da Fano salado:

nitrato de cobalto:	1 g
formol no neutralizado:	10 ml
cloruro sódico:	1 g
agua destilada:	90 ml

b) *Infusorios marinos:* líquido de Da Fano salado:

nitrato de cobalto:	1 g
formol no neutralizado:	10 ml
agua de mar:	90 ml

Fijar sobre el portaobjetos con dos o tres grandes gotas; se deja actuar durante unos diez minutos, retirar el fijador con una pipeta.

Sin lavar, *incluir* con gelatina salada: gelatina: 10 g + cloruro sódico: 0,05 + agua destilada: 100 ml, fundida a 25°. Depositar una gota sobre los ciliados, mezclar y extender una capa delgada. Dejar solidificar durante uno a diez minutos, sin secar.

Impregnar sobre el portaobjetos con nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos. Lavar con agua destilada (algunos segundos). *Reducir* a la luz bajo el agua destilada, cambiándola varias veces. Vigilar al microscopio. Deshidratar y montar con bálsamo.

■ IMPREGNACIONES EN FROTIS DE TEJIDOS O DE ÓRGANOS. — Fijar el frotis húmedo con el Da Fano, con el sublimado ósmico o con tetraóxido de osmio, después lavar, escurrir y recubrir con gelatina al 5 % salado. Mojar la capa de gelatina con nitrato de plata del 1 al 3 %. Escurrir, recubrir con la misma solución y reducir a la luz vigilando bajo el microscopio. Lavar con agua destilada y montar como si se tratara de una extensión. Puede hacerse el frotis sobre el cubreobjetos que finalmente se enganchará sobre el portaobjetos por su cara libre con bálsamo y seguidamente se recubrirá con otro cubreobjetos más ancho, montado también con bálsamo.

■ MÉTODO RÁPIDO DE CHATTON PARA LA IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA REDUCIDA CON LA HIDROQUINONA. — Este método puede aplicarse sobre frotis húmedos, sobre extensiones de gelosa o sobre cortes. Los frotis y las extensiones serán fijadas con el tetraóxido de osmio al 2 % y las piezas para cortar serán fijadas con el líquido de Champy o equivalente.

Cubrir la preparación con nitrato de plata al 3 % durante 5 minutos, protegido de la luz. Después verter sobre esta solución una gota de hidroquinona al 0,1 %.

El material debe volverse pardusco en menos de un minuto; de lo contrario, verter una segunda gota y así sucesivamente hasta que adquiera la tonalidad deseada. Comprobar observando los cortes al microscopio, iluminando intensamente. Lavar y montar.

Para estudiar los *corpúsculos birrefringentes de los ciliados* con luz polarizada, Deflandre aconseja observarlos en fresco, en frotis secos con la nigrosina o en frotis secos teñidos con hemalumbre-eosina, o incluso con el carmín clorhídrico, pero con la condición de no pasarlos por agua. Evitar también el formol.

Empleo del algodón hidrófilo. — Peters, en un trabajo en el que se encontrarán valiosos detalles sobre la manipulación de cultivos de ciliados, recomienda el empleo del algodón hidrófilo entre porta y cubreobjetos, para facilitar la fijación, la tinción y la conservación de los infusorios. Se coloca un poco de algodón sobre el portaobjetos y se embebe con el líquido que contiene los ciliados. No debe haber más líquido que el que pueda absorber el algodón. Seguidamente, con ayuda de alfileres se disocia para separar las fibras, y luego se coloca el cubreobjetos. Aplicar siempre el cubreobjetos horizontalmente, a fin de que los microorganismos queden aprisionados entre las fibras y no escondidos por ellas. Pueden hacerse pasar todos los reactivos, hasta llegar al bálsamo, bien sea manteniendo el portaobjetos plano y aspirando con el papel de filtro el líquido que hay que sacar o bien enganchado el cubreobjetos con dos anillos de caucho. En este último caso se puede inclinar el portaobjetos para hacer deslizar el líquido saliente o también se puede hacer pasar verticalmente por una serie de frascos de Borrel. Las fibras de algodón retienen los microorganismos e impiden que sean arrastrados durante las manipulaciones. Locquin prefiere las fibras de vidrio a las de algodón.

Empleo de la médula de saúco. — Volkonsky, para inmovilizar los protozoos muy móviles y sobre todo los ciliados utiliza cortes muy delgados de médula de saúco, obtenidos con el micrótomo de Lelon. A fin de eliminar el aire que contiene la médula se esterilizan los cortes al mismo tiempo que los medios de cultivo.

Anestesia. — Además de los procedimientos indicados en la página 119, Volkonsky utiliza un método reversible: cloretone: 1 g + somnífero Roche: 10 ml + líquido isotónico en 1500 ml de medio de cultivo.

Añadir una décima parte de esta mezcla en el medio que contiene los ciliados. Dejar actuar durante diez minutos, lavar rápidamente con agua y fijar. Esta anestesia es reversible, ya que pasan sus efectos cuando los ciliados son trasladados en el agua.

ESPIROQUETAS Y ORGANISMOS ESPIRALADOS

Consideramos estos microorganismos junto a los protozoos para simplificar nuestra exposición. No se trata del lugar adecuado para discutir sus afinidades, pero dado que para su estudio se emplean las mismas técnicas y métodos consideramos más cómodo exponer todos estos métodos en el mismo capítulo.

El estudio práctico de los microorganismos espiralados presenta sin embargo dificultades particulares, debido principalmente a su pequeño tamaño y a su escasa afinidad hacia las soluciones tintoriales rutinarias. El estudio de las preparaciones es preferible hacerlo en campo oscuro, se apreciarán muchos más detalles de su morfología.

Material de estudio. — Como en el caso de los tripanosomas, puede pedirse a un laboratorio un ratón inoculado con *Spirochaeta duttoni*, por ejemplo. De esta manera podrán obtenerse extensiones muy ricas. El sarro dental existente en todos los individuos, por muy cuidadosos que sean en su higiene personal, entre la encía y el diente, proporcionará varios tipos de espiroquetas y en gran abundancia. Para estudiar grandes especies se cogerá la *S. balbianii* que se encuentra en el cristalino de las ostras. Las lesiones sifilíti-

cas permiten el desarrollo de abundantes treponemas. Dejando pudrir algas de agua dulce en el agua se obtienen fácilmente *Spirochaeta plicatilis*. Finalmente, debemos mencionar que el tubo digestivo de los termes contiene cantidades ingentes de microorganismos espiralados.

Se han propuesto numerosos métodos de tinción y de observación de las espiroquetas; la mayoría de ellos únicamente tienen interés histórico. Sólo indicaré los que tienen interés en el diagnóstico.

La *microfluoroscopia* en manos de un experto puede ofrecer grandes servicios. Boch y Oesterlin aconsejan utilizar como fluorocromo el *rivanol* para reconocer las espiroquetas recurrentes y la *primulina* para las leptospiras. Estos colorantes se prepararán en soluciones acuosas al 0,1 % y se dejarán actuar durante cinco minutos. En el caso de utilizar la primulina debe añadirse un 2 % de fenol, que actúa como mordiente, y evitar el fijar previamente las extensiones. En caso de utilizar el rivanol, fijar previamente con metanol.

I. — Métodos para la tinción de las extensiones

Método de Romanovsky. — La superioridad incuestionable de este método sobre los restantes proviene en parte del hecho de que el fondo quede apenas teñido y, por consiguiente, los elementos celulares destaquen al tomar diversas tonalidades. Los hematíes quedan rosados, los leucocitos violetas, con el citoplasma de color azul más o menos intenso, los hematoblastos quedan violáceos, así como las espiroquetas, es por lo que su localización, así como la de los treponemas resulta altamente facilitada. Utilizaremos el *panóptico* y el *pancromo*.

Coles señaló en 1915 un sistema fácil y cómodo de observar las preparaciones teñidas con este método. Se observa en campo oscuro y en seco, sin aceite de cedro sobre la preparación. Los treponemas aparecen como hermosas espirales doradas. Es lo que anteriormente se ha descrito con el nombre de *efecto Berek* (página 283).

E. Hoffmann ha utilizado este sistema y aconseja las siguientes técnicas tintoriales que aseguran un desteñimiento profundo y suficiente del fondo.

■ GIEMSA-TANINO DE KRAUSS. — Las extensiones efectuadas sobre portaobjetos totalmente desengrasados, sin fijar previamente son cubiertas por la siguiente mezcla: agua destilada: 10 ml + carbonato potásico al 1 %: una o dos gotas + Giemsa: 20 a 25 gotas. Calentar hasta que haya emisión de vapores, después eliminar el exceso de colorante y volver a empezar, y seguir esta marcha 4 o 5 veces, utilizando en cada ocasión colorante nuevo. Lavar con agua destilada y desteñir el fondo con tanino al 25-30 %. Secar. También se puede teñir de doce a veinticuatro horas, en frío, por el sistema rutinario y diferenciar con tanino.

■ OSMIO-GIEMSA-TANINO DE HOFFMANN. — Hacer las extensiones y fijarlas con vapores de osmio siguiendo el método de Weidenreich, pero sin emplear el ácido acético ni el permanganato. Teñir durante doce a veinticuatro horas con la mezcla: agua destilada: 40 ml + carbonato potásico: 50 a 60 gotas. Diferenciar como en el caso anterior.

Método de los colorantes básicos. — Este método consiste en emplear soluciones concentradas de azul de metileno, de varios violeta, de pararrosanilina las cuales ofrecen tinciones monocrómicas. El procesado es sumamente sencillo y tiene el éxito asegurado.

Procedimiento de Sabrazès (1926). — Es el más sencillo de todos y da excelentes resultados cuando se aplica cuidadosamente, siguiendo las orientaciones dadas por el autor.

Fijar la extensión con el calor (la extensión debe ser muy delgada), pasándola tres veces consecutivas sobre la llama del Bunsen, con la extensión hacia arriba. *Teñir* con el líquido de Ziehl puro, no diluido, calentando tres veces, hasta la emisión de vapores. El colorante no debe hervir ni secarse. *Lavar* con precaución en un cristalizador lleno de agua. Secar. Examinar con aceite de cedro.

Método de tinción-lacado con azul de metileno. Es el mejor método de estudio para localizar y diagnosticar todos los microorganismos espiralados y en particular de las espiroquetas sanguínolas (recurrentes). Aplicar según la variante de H. Simons (azul T3 y T5) o la de Suter-Geigy, en gota líquida más o menos espesa (ver p. 281). En campo claro las espiroquetas aparecen como tirabuzones azules, o como muy delgados filamentos espiralados; en campo oscuro, el *efecto Berek* determina que las espiroquetas teñidas con el azul de metileno adquieran una tonalidad rojo intensa y brillante que las hace destacar inmediatamente, incluso en el caso de no ser muy numerosas.

Método de las impregnaciones metálicas. — Anteriormente se han indicado los métodos aplicables sobre extensiones: el de Fontana a base del complejo amoníaco-argéntico y el método de Río Hortega al carbonato de plata amoniacal. Estos procedimientos dan una intensa coloración a los organismos espiralados, pero cuando son aplicados sin precaución los deforman muchísimo. El procedimiento de Tribondeau es el peor a nuestro juicio. Para seguir estos métodos véase la página 248.

II. — Métodos para la tinción de cortes

Método de Romanovsky. — Cuando debe aplicarse sobre cortes de órganos debe procederse a las modificaciones ideadas para garantizar el éxito de la técnica.

Método de las impregnaciones metálicas. — Este método, junto con el de Romanovsky, es el que da los resultados más demostrativos y a la vez más constantes. Las impregnaciones en bloque de diversos órganos se hace siempre con el nitrato de plata. Salvo indicaciones contrarias (acción reductora de la luz), las operaciones de impregnación y de reducción deberán hacerse en *frascos de vidrio opal* y a ser posible en la oscuridad. Es esta una precaución y recomendación muchas veces olvidada y por consiguiente motivo de numerosos fallos. El *peso* del nitrato de plata disuelto debe ser a su vez superior al de las piezas a impregnar.

Las impregnaciones metálicas gozan del favor general, puesto que dan preparaciones muy nítidas y duraderas. Tienen también la ventaja de dar excelentes resultados al actuar sobre materiales conservados desde mucho tiempo en formol.

Los métodos de impregnación que siempre dan buen resultado sobre los cortes son todos ellos a base de nitrato de plata *sin complejo;* conllevan la utilización de un *medio coloidal;* resina mastic, celofán, gelatina o gel de almidón. Finalmente, estas operaciones suelen iniciarse con un tratamiento previo con el *nitrato de uranio*, el cual evita la impregnación de fondo y hace que los microorganismos espiralados destaquen mucho más.

Método de Dieterle (1927). — Este método tiene la finalidad de impregnar las espiroquetas sobre cortes y no en bloque. Puede actuar sobre cortes obtenidos por congelación, por inclusión en celoidina o en parafina. El material debe haber sido previamente fijado con formol al 10 %.

Tratar los cortes durante unos treinta minutos a 55° con una solución de *nitrato de uranio* al 1 % en alcohol de 70° para impedir la impregnación de otras estructuras. *Lavar* con agua destilada, después con alcohol de 90°. Pasar los cortes individualmente durante treinta segundos por una solución al 10 % de *resina mastic* en alcohol absoluto. *Lavar* con alcohol de 96° y después con agua destilada. *Impregnar* durante una a seis horas en la oscuridad, a 55°, en nitrato de plata al 1 %. *Lavar* con agua destilada. *Reducir* durante cinco a quince minutos con:

Hidroquinona: 1,5 g + sulfito sódico: 0,25 g + formol neutro: 10 ml + acetona: 10 ml + piridina: 10 ml + agua destilada, hasta llegar a los 90 ml. Una vez disuelto añadir 10 ml de una solución al 10 % de resina mastic en alcohol absoluto, de manera que el líquido se vuelva lechoso. Lavar con agua destilada. Disolver el mastic y deshidratar con alcohol de 96°. Terminar de deshidratar con acetona, xilol, bálsamo.

El método da igualmente resultados positivos cuando se aplica sobre material formolado ya antiguo: la acidez del formol empleado en la fijación no interfiere con la impregnación. También puede aplicarse este método sobre extensiones.

Método de Warthin-Starry (1920-1929). — Este método, así como el de Dieterle, tiene como finalidad la impregnación de espiroquetas sobre cortes. El gel coloidal se obtiene por una mezcla en partes iguales de almidón y gelatina. El empleo eventual del ácido nítrico permite localizar más fácilmente la reducción del nitrato de plata sobre las espiroquetas.

Fijar con formol al 10 %. Incluir en parafina y obtener cortes de 6 a 10 μ; pegar dichos cortes sobre cubreobjetos. *Tratar* los cortes durante treinta minutos con el ácido nítrico. *Lavar* rápidamente con agua destilada. *Impregnar* con nitrato de plata al 2 %. Los cubreobjetos portadores de los cortes deben ser recubiertos por otro cubreobjetos de manera que el corte quede aprisionado entre dos cubreobjetos. Los pares de cubreobjetos son depositados verticalmente en una capa de solución argéntica que únicamente debe cubrir la parte inferior. Poner todo el conjunto a la oscuridad y a 50-55° durante treinta minutos a dos horas, atendiendo al tipo de material que se está estudiando. Los tejidos densos y fibrosos exigen más tiempo que los tejidos parenquimatosos. *Sin lavar* deben separarse los dos cubreobjetos con suma precaución. Para *reducir*, depositar los cubres, con los cortes hacia abajo, en una caja de vidrio y verter encima el reductor: nitrato de plata al 2 %: 10 ml + mezcla reductora de almidón-gelatina-acetona-quinol: 50 ml preparada como se indicará más adelante.

Los cortes deben cubrirse por una capa de líquido que tenga como mínimo unos 3 milímetros de grosor. Se deja actuar hasta que adquieran una tonalidad amarillo-pardo clara. *Lavar* algunos segundos con agua caliente para eliminar el almidón y la gelatina. *Fijar* con hiposulfito sódico al 5 %. Lavar con agua destilada; deshidratar y montar.

Preparación del reductor. — A) Agua destilada: 100 ml + gelatina blanca: 10 g. Disolver en caliente a baño maría y filtrar en caliente sobre un paño. Recoger el filtrado en un matraz que nos servirá de reserva. B) Almidón: 10 g, deshacer con muy poca agua destilada fría, de manera que se obtenga una pasta espesa que se regará con 100 ml de agua destilada hirviendo. Mezclarlo todo y verter el resultado en el matraz que contiene A, sin filtrar. Mezclar bien las dos solu-

ciones. C) Acetona: 5 ml + solución acuosa de quinol al 5 % recientemente preparada: 7 ml.

Mezclar y verter en el matraz de reserva que ya contiene las soluciones A y B. Tapar bien y agitar enérgicamente y dejar enfriar. Se licúa la mezcla al baño maría cada vez que se necesita y se agita fuertemente para homogeneizarlo. D) Inmediatamente antes de emplearla deben mezclarse cinco partes de la solución gelatina-almidón-acetona-quinol con una parte de nitrato de plata al 2 %.

El medio coloidal lentifica la reducción y la hace más regular.

■ Acción del ácido nítrico. — Los autores de este método han reconocido que las irregularidades en la reducción del nitrato de plata y en la impregnación de los treponemas son debidas principalmente al pH de los tejidos. Efectivamente, la impregnación argéntica no es una reacción específica y por consiguiente no tiene una especificidad hacia las espiroquetas. Éstas actúan únicamente como corpúsculos extraños, a nivel de los cuales la plata reducida se deposita más intensamente. El empleo del doble cubreobjetos es para limitar el contacto entre el tejido a impregnar y la solución argéntica. El tratamiento con el ácido nítrico tiene como misión la de acidificar los cortes, disminuyendo por consiguiente su pH, retrasa la precipitación de la plata reducida y hace que sea más selectiva. Los treponemas resisten mejor que los tejidos a la acción del líquido ácido, por lo que se impregnan con mayor rapidez. Se comportan como islotes básicos en un medio ácido. El ácido nítrico disuelve también los precipitados inorgánicos que podrían fijarse sobre la plata reducida en detrimento de los treponemas. Finalmente, en tercer lugar, el ácido nítrico actúa como agente oxidante y rejuvenece los tejidos sobrefijados o conservados desde hace muchos años. El tratamiento nítrico es pues inútil en el caso de los tejidos recientemente bien fijados. En el caso de las piezas mal fijadas o que presentan alteraciones cadavéricas, los cortes se pasarán durante un minuto por ácido nítrico al 1 %. Para las viejas piezas conservadas en alcohol se utilizan soluciones del 2 al 10 % durante quince a sesenta minutos. Cuanto más concentrada sea la solución deberá actuar durante menos tiempo.

Método modificado. — R. R. Faulkner y R. D. Lillie han modificado el método primitivo introduciendo la utilización de soluciones tampón que permiten trabajar a un pH fijo y eliminando el empleo empírico del ácido nítrico. Parece ser que el mejor pH es el comprendido entre 3,6 y 3,8. Puede utilizarse uno de los dos tampones de Walpole, uno es a base de acetato sódico-ácido acético y el otro es a base de citrato sódico-ácido cítrico; este último disuelto en alcohol etílico de 25°. Estos dos tampones presentan la ventaja de no hacer precipitar las sales de plata.

Preparación del reductor. — En el momento de usar preparar:

A. *Solución madre de gelatina.* — Disolver 5 g de gelatina en 100 ml de agua tamponada; dejar durante una hora a la estufa a 65°.

B. *Nitrato de plata* al 2 % en agua tamponada.

C. *Hidroquinona* al 3 % en agua tamponada (unos 0,3 g en 30 ml de agua tamponada).

Conservar las soluciones argénticas en frascos amarillentos (opales) y en la oscuridad.

En el momento de usar deben cogerse:

A: 15 ml + B: 3 ml + C: 1 ml. Trabajar en la oscuridad y en caliente.

Un pH demasiado bajo disminuye la intensidad de la tinción, un pH alto la incrementa. El pH óptimo está comprendido entre 3,6 y 3,8.

Fijar, incluir, obtener cortes, desparafinar siguiendo el método rutinario, trabajando sobre el *portaobjetos*.

Tratar los cortes con *agua tamponada*, preparada disolviendo 20 ml de tampón en 480 ml de agua destilada.

Impregnar con nitrato de plata al 1 % en agua tamponada a pH 3,6-3,8, durante cuarenta y cinco minutos a 55-60° (estufa de parafina).

Reducir sobre los portaobjetos con el reductor previamente calentado, a 55-60°, de tres a cinco minutos, hasta que los cortes consigan una tonalidad amarillo dorada o amarillo grisácea, con lo que el reductor se va volviendo negrusco. Lavar con agua caliente (55-60°) y después con agua destilada.

Deshidratar y montar (preferentemente debe pasarse por xilol-esencia).

Si se desea una tinción de contraste, por ejemplo con hemalumbre-eosina, previamente debe haberse hecho un viraje con cloruro de oro ácido al 1 % durante tres minutos.

Método de Madureira Para (1946). — Los tejidos deben estar fijados con formol al 10 %.

1. **Método de base**

■ Reactivos:

A. *Nitrato de uranio* al 1 %.

B. *Nitrato de plata* al 1,5 %. A preparar en el momento de usar o bien guardar en un frasco opal y en la oscuridad.

C. *Nitrato de plata litinado.*

Calentar 100 ml de nitrato de plata al 0,2 %, casi hasta la ebullición, y añadir 2 ml de una solución saturada de carbonato de litio (casi al 1,3 %), en frío. Esta solución será preparada con unos cuantos días de antelación. Calentar gra-

dualmente la mezcla y hacerla hervir durante uno o dos minutos. El líquido opalescente se filtra con papel. Guardar en la nevera (se conserva como máximo un mes).

D. *Colofonia* (o bálsamo de Tolu) al 5 % en alcohol absoluto. Guardar en la nevera.

E. *Reductor:* ácido pirogálico: 4 g + formol: 5 ml + agua destilada: 100 ml.

En lugar del ácido pirogálico puede utilizarse una solución de 1 g de hidroquinona en 60 ml de agua destilada.

■ TÉCNICA. — Tratar los cortes de 4 a 6 μ con *nitrato de uranio*. Durante treinta minutos a temperatura ambiente. Lavar rápidamente con agua destilada. Impregnar con *nitrato de plata* B, durante dos horas a 56°, renovando el líquido cada hora a partir de la primera (puede no cambiarse el líquido si se trabaja a 37° y durante doce horas). Lavar rápidamente con agua destilada. *Sensibilizar* con una solución coloidal de nitrato de plata litinada C, durante una hora a la temperatura ambiente.

■ SENSIBILIZADOR: Solución C (nitrato de plata litinado): 45 ml + solución D (colofonia): 5 ml. *Reducir* con E durante diez a quince minutos a temperatura ambiente. *Lavar* rápidamente con agua destilada. Observar. Si la impregnación es insuficiente, lavar con alcohol absoluto y volver a empezar con la sensibilización C durante cinco a diez minutos. Deshidratar y montar. Los cortes deben tener una tonalidad pardo-amarillenta, los núcleos deben quedar pardos y las espiroquetas negras.

2. **Método rápido** (en dos horas).

■ REACTIVOS:

A. *Nitrato de plata* al 1 % a preparar en el momento de usar.

B. *Carbonato de litio*, en solución acuosa saturada: 1 ml + agua destilada: 165 ml, únicamente se conserva unos cinco días a temperatura ambiente.

C. *Colofonia* al 2 % en alcohol de 95°. Preparar inicialmente una solución alcohólica al 50 %; filtrarla tres veces con papel y conservarla en la nevera. Antes de usar debe diluirse con 25 partes de alcohol, a fin de tener una solución al 2 %.

D. *Reductor* como en el caso anterior.

■ TÉCNICA. — *Sensibilización* durante una hora a 56° con el sensibilizador recién preparado:

Nitrato de plata A: 30 ml + carbonato de litio B: 10 ml + colofonia C: 10 ml.

Mezclar primero A y B y seguidamente añadir C.

Reducción durante siete a diez minutos a la temperatura ambiente en: reductor: 50 ml + colofonia C: 5 ml.

Lavado con dos o tres baños de *alcohol de 90°*, de cinco minutos cada uno. Lavado rápido con agua destilada. Volver a poner en el sensibilizador A durante quince minutos a 56°. Reducir nuevamente durante tres a cinco minutos a 56°. Lavar con dos baños de alcohol de 90° de diez minutos cada uno. Deshidratar y montar.

III. — Procedimientos especiales

Espiroquetas de gran tamaño. — Estas formas deben ser fijadas en frotis húmedo con el líquido de Bouin, el Duboscq-Brasil o el sublimado de Schaudinn, pero este último, según Schellack altera los microorganismos, dándoles un aspecto granuloso y desconocido. Teñir seguidamente con hematoxilina alumínica o férrica.

Localización de espiroquetas sanguínolas. — Cuando los parásitos son abundantes se hacen extensiones ordinarias que se teñirán con el método panóptico. Si son escasas, deberá hacerse las gotas gruesas que se tratarán con el método descrito anteriormente. Los procedimientos de observación en fresco y de tinción vital y posvital son los mismos que en el caso de los plasmodios. Aquí también recomendamos el método de la tinción-lacada al azul de metileno, según las variantes de H. Simons y de Suter-Geigy (ver más arriba, p. 281) facilitarán enormemente la localización y estudio de estos parásitos. La *punción medular* prestará igualmente buenos servicios.

El método de la triple centrifugación de Martin y Leboeuf debe desecharse. Hay que tener presente que J. G. Thomson ha demostrado la frecuente presencia de seudoespiroquetas en los sedimentos de la tercera centrifugación de la sangre del hombre y de animales sanos y enfermos. Debe adoptarse la mayor rigurosidad en la observación de sangre por este método; se trata de preparaciones teñidas o de material fresco observado en campo oscuro. Este es un punto sobre el que ha insistido mucho Wenyon.

Según Suldrey, la punción hepática permite hacer el diagnóstico *post mortem* de la fiebre recurrente.

Localización de treponemas. — Los procedimientos utilizados en el diagnóstico pueden clasificarse en ocho categorías:

1. **Observación tras la tinción con el Romanovsky** de las extensiones hechas con los productos patológicos (serosidades de las lesiones, producto obtenido por punción ganglionar). Esta observación puede hacerse en campo claro o en campo oscuro.

2. **Impregnación argéntica.** — Ya hemos descrito con anterioridad este método y hemos indi-

cado que gracias a la deshemoglobinización es posible hacer frotis bastante espesos y por consiguiente más ricos en parásitos.

El punto clave es por consiguiente la *extracción*. Proceder como se indica en esta página para la extracción de la serosidad que se deposita sobre portaobjetos totalmente limpios y desengrasados, a modo de gotas que se extenderán como si se tratara de sangre.

Secar e impregnar siguiendo los métodos anteriormente descritos.

3. **Método de P. Seguin para la tinción del gránulo espiroquetógeno** (1939). — Este método deriva de las técnicas propuestas por Van Ermengen y de Fontana. Su buen resultado exige la obtención de preparaciones muy cuidadosas: el material debe estar desprovisto de toda traza de medio de cultivo por lavados sucesivos y por centrifugaciones. La emulsión en agua destilada debe verificarse con una observación en campo oscuro.

Fijar con vapores de tetraóxido de osmio las gotitas de emulsión alineadas sobre un portaobjetos totalmente limpio. Secar y sobrefijar sobre el portaobjetos con alcohol absoluto que se dejará evaporar. Dejar actuar el *mordiente* como en el caso de la tinción de los flagelos bacterianos, con el mordiente de Van Ermengen, durante diez minutos. Ligero calentamiento hasta que haya emisión de vapores. Lavar con abundante agua corriente, después con agua destilada, a fin de eliminar las trazas de mordiente. *Impregnar* con el nitrato de plata amoniacal (fórmula de Fontana) sobre portaobjetos durante diez minutos. *Virar* con cloruro de oro al 0,5 %, lavar y aclarar con cloruro de platino al 0,95 %. Si la preparación ha quedado demasiado pálida, debe intensificarse con el Ziehl diluido. Lavar, secar, conservar montada con bálsamo neutro y cementar el cubreobjetos.

4. **Examen en campo oscuro.** — El empleo del campo oscuro permite hacer muy rápidamente y con toda certeza un diagnóstico microscópico de la sífilis, dado que en las preparaciones frescas el treponema se distingue fácilmente de todos los otros microorganismos espiralados. Para todo lo referente a la técnica de iluminación cuando se trabaja en campo oscuro remitimos al lector a la página 34 donde esta cuestión ha sido ampliamente tratada. Se examinarán todas las lesiones sospechosas, genitales o extragenitales, sin olvidar el raspado de la cara interna de las amígdalas. Ver más arriba (p. 283) el *efecto Berek*.

1.° Extracción del exudado. — a) *Lesiones abiertas*. A fin de poder hacer una buena observación debe hacerse salir de las heridas abiertas *únicamente serosidades pero no sangre*. La serosidad debe proceder del cuerpo papilar de la dermis donde los treponemas son muy abundantes. Por lo cual hay que limpiar, inicialmente, la ulceración, con sumo cuidado con una torúndula de algodón hidrófilo ligeramente embebido de agua esterilizada o incluso con éter de petróleo, tal como aconsejan Arning y Klein, de manera que se puedan eliminar todas las costras. Secar seguidamente con una torúndula seca y esperar unos instantes. Se ve aparecer sobre la superficie así limpiada la serosidad que se recogerá inmediatamente con un vaccinostilo. Se coloca una gota entre porta y cubreobjetos, totalmente limpios y se cementa con vaselina o con parafina líquida, para evitar el exceso de aire y la evaporación. El resultado dependerá del nivel donde se haya efectuado la extracción de la serosidad, si es más profundo o bien pertenece a los bordes, son detalles que influyen en la calidad de la preparación obtenida. En caso de necesidad, pueden hacerse con el vaccinostilo una serie de escarificaciones a caballo sobre el borde del chancro, de manera que las papilas dérmicas supuren serosidades más profundas y por consiguiente más ricas en treponemas. Si la superficie limpiada o rascada sangra, debe eliminarse la sangre hasta que aparezca la supuración.

Nunca debe diluirse la serosidad con agua, ya que ésta hincha el treponema y le da una morfología que lo hace irreconocible. Si estamos obligados a diluir la serosidad debe utilizarse forzosamente la solución fisiológica.

b) *Lesiones cerradas*. Cuando se trata de *lesiones cerradas* deben puncionarse preferentemente sus bordes. Las *pápulas* serán rascadas ligeramente. En las *pústulas* y las *ampollas* se extraerá la serosidad del fondo de la lesión.

Sézary, Lefèvre y Bottreau han insistido en la punción ganglionar para efectuar el diagnóstico precoz de la sífilis en el caso de que la observación del exudado del chancro dé negativa. Para ello se utiliza una aguja de 3 centímetros de largo por 8 décimas de diámetro, montada sobre una pequeña jeringa de 2 ml. Se aspira un pequeño cilindro de pulpa que se depositará sobre uno o varios portaobjetos.

2.° Aspecto del Treponema pallidum. — En el campo de observación microscópica generalmente se apreciará una multitud de elementos de dimensiones variables. Se trata de los hematíes de contorno circular muy delicado; leucocitos, más voluminosos, irregulares y repletos de granulaciones brillantes; células epiteliales con forma de losetas de un mosaico, con grandes elementos poligonales, finamente granulosos y con un gran núcleo denso. En los espacios vacíos circulan granulaciones de todos los tamaños, más o menos móviles, y entre ellas los treponemas, delgados

filamentos brillantes con delicadas espiras muy regulares.

Atendiendo a una serie de condicionamientos técnicos, como pueda ser el enfoque, la regulación de la luz, el estado de conservación de la preparación, su motilidad, estos microorganismos aparecerán más o menos nítidamente bajo su forma típica. En algunos casos, la espiral aparece muy nítida y los extremos afilados muy visibles. En otras ocasiones, sobre todo cuando la iluminación no está bien centrada, se aprecian una serie de *puntos brillantes* o de *pequeñas líneas oblicuas*, regularmente dispuestas en línea recta o algo sinuosa: estas puntuaciones y estos bastoncillos vibran, por consiguiente puede pensarse que se trata de treponemas en movimiento.

Entre estos movimientos cabe distinguir los movimientos propios del microorganismo de los que se deben a las corrientes. Los movimientos propios del treponema se manifiestan como ondulaciones que recorren la espiral de un extremo al otro. El organismo se desplaza de esta manera, bien sea en el plano de la preparación bien en el plano vertical y oblicuo; en este último caso se ve desaparecer más o menos completamente y para poder seguir observándolo debe accionarse el tornillo micrométrico. Pero estos movimientos son muy lentos y muy distintos a los que presentan las demás espiroquetas. Éstas se desplazan muy rápidamente, con un movimiento de rotación o mediante ondulaciones similares a las adoptadas en la natación de las anguilas. La *Spirochaeta dentium* tiene movimientos más rápidos que los del treponema. Por otra parte, la motilidad de esta última varía mucho atendiendo a las características del medio (agua, suero artificial, suero normal, etc.) y a la temperatura.

5. **Diagnóstico de la sífilis por tinción-lacada con el azul de metileno.** — Consúltese la página 281 para ver las generalidades de esta técnica.

Mezclar 4 o 5 asas grandes de serosidad de un acceso primario o de un material cuanto más abundante mejor, procedente de pápulas o de condilomas de accesos primarios o secundarios, con un asa T3 de Simons o de colorante de Suter-Geigy.

En este caso no importa que el material esté o no mezclado con sangre, ya que ésta será destruida con el lacado.

Examinar con un objetivo de gran aumento en seco y en campo oscuro a fin de utilizar el *efecto Berek*, es decir, apreciar la luminosidad rojiza manifestada por los treponemas tratados por la tinción-lacada del azul de metileno.

En estas condiciones la observación de las lesiones secundarias es tan fructífera como la que se obtiene al estudiar las lesiones primarias. Los parásitos mueren instantáneamente y su luminosidad es algo más amarillenta o dorada que la de las espiroquetas recurrentes y la de las leptospiras. Este aspecto es tan nítido y reconocible como el brillante plateado, tan familiar a los dermatólogos que practican la observación en campo oscuro, *in vivo* y sin teñir. En ambos casos, se observa el aspecto del espiral rígido y muy apretado, ya descrito por Schaudinn.

Los aumentos óptimos de trabajo para observar los treponemas oscilan de 350 a 550, e incluso 750 aumentos. Lo que se pierde en aumentos al no trabajar con los objetivos de inmersión se gana en cuanto a la claridad de las imágenes y en la superficie del campo de observación (aunque se trabaje con óptica de gran campo). Gracias al lacado, el grosor de la preparación ya no es un obstáculo, dado que los elementos voluminosos como puedan ser los eritrocitos y los leucocitos ya no pueden difractar la luz que enmascararía los parásitos.

6. **Observación con el método de la tinta China.** Este método, muy atrayente por su extrema simplicidad, ha sido objeto de numerosas publicaciones, sobre todo en Alemania. Como ya se ha indicado en la p. 204, el procedimiento original de Burri ha sido adaptado para este tipo de estudios en particular. Este método tiene como finalidad la de proporcionar un medio mucho más sencillo y con imágenes análogas a las que se obtienen con la iluminación en campo oscuro. El líquido a observar está mezclado con la tinta China y extendido sobre el portaobjetos. Los elementos figurados aparecen como manchas claras, de contornos muy nítidos, sobre el fondo oscuro o pardusco impreso por la tinta China al secarse.

Detallamos a continuación cómo debe procederse para el estudio de los treponemas:

1.° *Extraer* el exudado seroso como se ha indicado anteriormente para el estudio en campo oscuro.

2.° *Mezclar* sobre una gota de este líquido una cantidad igual de tinta China, preparada según se ha descrito anteriormente (técnica bacteriológica). La mezcla debe hacerse cuanto más rápidamente mejor y lo más perfecta y homogénea posible.

3.° *Extender* en capa delgada, bien sea con el cubreobjetos, como en el caso de la sangre, o bien con una varilla delgadísima de vidrio o con un hilo de platino. Los frotis deben tener una tonalidad pardo clara. Secar por agitación, sin calentar.

4.° *Observar* con una gota de aceite de cedro. Los hematíes forman anchas manchas circulares y claras, las bacterias y los restos celulares forman manchas de morfología y dimensiones muy variables. Los organismos espiralados aparecen bajo forma de espirales claras; se determinan atendiendo a sus caracteres morfológicos.

Según Gins, este procedimiento está destinado

a sustituir todas las técnicas de tinción, dado que hábilmente utilizado permite incluso llegar a observar los flagelos de los treponemas. Sin embargo, no está exento de poder incurrir en errores si no se tienen en cuenta una serie de hechos: Barach llama la atención sobre una posible confusión con las espiroquetas y con formaciones análogas procedentes de la tinta.

Harrison sustituye la tinta China por el collargol. Este último se vende en polvo y mezcla una parte con 19 partes de agua destilada y la conserva en frasco opal.

7. **Biopsia** y localización del treponema en los tejidos por uno de los métodos aplicados sobre cortes histológicos.

8. **Localización en las aposiciones de órganos.** Momentáneamente existen pocos trabajos sobre este aspecto, pero se ha de tener presente, ya que permite efectuar un diagnóstico retrospectivo de la sífilis y puede tener un gran interés en medicina legal.

Desde 1907, Zabel indicó que pueden fijarse fragmentos de órganos en formol y conservarlos en él. Para buscar los treponemas, debe cortarse un fragmento del órgano del tamaño de una judía y se deja en agua destilada durante un cuarto de hora. Se seca con papel de filtro y se hace una aposición.

Estas extensiones serán teñidas con el Giemsa o con un colorante básico fenicado.

Dupérié, más recientemente, ha demostrado que las piezas conservadas en formol dan excelentes resultados. La fijación debe hacerse con formol al 10 %: las piezas deben permanecer mucho tiempo en este fijador. Las extensiones secas, fijadas con alcohol, se teñirán con el Giemsa alcalinizado (10 ml de agua destilada + quince gotas de Giemsa + diez gotas de carbonato de sodio al 0,1 %).

Hecht y Wilenko encuentran treponemas con el procedimiento de la tinta China en los órganos conservados en formol. Basta con rascar la superficie del órgano, eluirla con agua destilada y mezclar una gota de este medio con una gota de tinta China, como se ha indicado anteriormente.

Leptospiras. — Cuando estos microorganismos están bien conservados presentan siempre un *gancho* seguido de una línea recta en sus dos extremos. Con el método de la tinción-lacado del azul de metileno adquieren una tonalidad primero azulada, después se vuelven rosados y finalmente adquieren un color rojo intenso. Son varias veces más largos (casi 8 veces) que los eritrocitos. La observación en campo oscuro facilita su localización, incluso cuando se trabaja en seco, como se ha señalado anteriormente, ello es debido al *efecto Berek*.

Localización de la espiroqueta icterígena. — El procedimiento más sencillo es *buscarla en la orina*. Para recoger este líquido debe lavarse previamente y de forma cuidadosa el meato; después, hacer orinar al enfermo en un vaso esterilizado. *Centrifugar* enérgicamente (de 3 a 4000 revoluciones durante 30 minutos) después teñir el sedimento con el método panóptico (2 horas) o con impregnación argéntica.

Método de Lévy y de Léobardy (1918). — Siguiendo esta técnica se evita la centrifugación. Se basa en el hecho de que los elementos largos y firmes deben ser fácilmente atrapados y vehiculados por esférulas de una emulsión.

Es preferible utilizar tubos de gran calibre que permiten trabajar con una gran cantidad de orina.

1) *Formolar* la orina inmediatamente después de haber sido emitida para asegurar la conservación de las espiroquetas, que serían destruidas por fermentación; añadir de 5 a 6 ml de formol comercial en 100 ml de orina, agitar, esperar dos a cinco minutos. La orina tratada de esta manera se conserva muy bien.

2) *Emulsión.* Verter 6 ml de alcohol de 95° en un tubo, seguidamente decantar de 40 a 50 ml de orina formolada y agitar varias veces para asegurar una buena mezcla. El alcohol se utiliza con la finalidad de evitar la formación de espuma.

Verter sobre este líquido de 2 a 3 milímetros de *ligroína* y tapar con tapón de corcho. Debe quedar una altura de 2 a 3 centímetros de aire, entre el líquido y el tapón.

Agitar violentamente durante un minuto y dejar reposar al menos durante quince minutos, o mejor media hora si es posible.

3) *Extracción de la emulsión.* Es la fase más delicada. Aspirar la emulsión con una pipeta cuyo extremo ha sido cortado bien derecho y que sea portadora de una tetina de caucho. Mantener el extremo de la pipeta en contacto con el vidrio y no aspirar el líquido subyacente. Recoger el material así aspirado en un vidrio de reloj.

4) *Extensión.* Utilizar portaobjetos bien flameados y enfriados. Depositar sobre cada portaobjetos tres gotas de la emulsión y dos gotas de alcohol absoluto. Extender correctamente y mezclarlos con el extremo de la pipeta. Dejar secar y teñir con el Fontana.

Método de entrenamiento-centrifugación química de Simons. — Para conocer la base de esta técnica y los reactivos a utilizar les remito a la página 294.

Aquí deben utilizarse dos reactivos para poder tratar fácilmente el precipitado, como en el caso del líquido cefalorraquídeo.

1. Cinco mililitros de orina recientemente emitida son vertidos en un tubo de centrífuga con

una gota de formol E. Mézclese bien con un agitador delgado.

2. En un vaso de precipitados acodado de 100 ml verter con la pipeta 1 ml de sulfato de zinc B, mojando únicamente el fondo del vaso de precipitados.

3. En el tubo de centrífuga en el que se ha dejado el agitador, se coloca con una pipeta 1 ml de solución amoniacal D. Agitar enérgicamente durante unos segundos.

4. *Trasvase brusco* como en el caso del líquido cefalorraquídeo. El precipitado de hidróxido de zinc engloba las leptospiras.

5. *Centrifugar* como se ha indicado más arriba, cuatro o cinco minutos a 3000 revoluciones. Si el precipitado es de 1,8 a 2 ml engloba aproximadamente a todas las leptospiras. Centrifugar todavía de nueve a doce minutos más para comprimir el sedimento a la mitad.

6. *Disolución del precipitado*. Ensayar los líquidos F, G, H.

Si la disolución no se lleva a cabo con el H, añadir un gran asa de ácido acético al 20 % a la mezcla del precipitado y de la solución H.

7. Observar en campo oscuro, pero el *efecto Berek* únicamente se da con el líquido G, y muy débilmente. El aspecto de los ganchos terminales es suficiente para establecer un diagnóstico.

Localización en los órganos. — Para encontrar la espiroqueta icterígena en los órganos de los animales de experimentación basta con hacer aposiciones con dichos órganos, dejar secar las extensiones y teñirlas o impregnarlas como se ha descrito anteriormente.

V. — MÉTODOS MICOLÓGICOS EN ZOOPATOLOGÍA

TÉCNICAS ZOOPATOLÓGICAS

En el hombre y en los animales pueden encontrarse hongos parásitos: en la epidermis y en las faneras (cabellos, pelos, uñas); en los líquidos patológicos (pus, esputos, secreciones nasales, líquido cefalorraquídeo, vómitos, excrementos, mucosidades vaginales), así como en los tejidos.

Ante todo, debemos decir que en los dos primeros casos (lesiones cutáneas y líquidos patológicos), el método de estudio más sencillo y seguro es la *observación en fresco*, sin fijación ni tinción, únicamente con la ayuda del Lugol doble, del lactofenol o del clorolactofenol, según los casos. Sólo en el caso de que haya que poner de manifiesto los hongos en los tejidos del huésped debe recurrirse a la técnica histológica, y para ello veremos que con uno o dos métodos es suficiente.

Técnicas para los actinomicetos

La tradición hace que los actinomicetos sean estudiados bajo la denominación de microsifonados junto con los hongos.

Independientemente de esta cuestión y sin hacer consideraciones de tipo sistemático, que se alejan de nuestro propósito, sólo indicaremos que este tema está tratado deficitariamente en los manuales de bacteriología y aquí únicamente los consideraremos desde su aspecto técnico.

Dejando aparte las lesiones pilosas producidas por los microsifonados, se puede decir *grosso modo* que los actinomicetos producen las actinomicosis, tumores micósicos que presentan la tétrada sintomática de los micetomas, es decir, los siguientes caracteres: *tumefacciones* fistulosas, que tienen pus y este pus tiene en suspensión *granos*, principal característica de los micetomas. El diagnóstico y estudio micológico de las actinomicosis se basan pues en el hallazgo, aislamiento y tratamiento técnico de los *granos*.

1.° **Localización de los granos.** — En general, no presenta grandes dificultades. Basta con extender un poco de pus sobre un portaobjetos y observarlo a simple vista o al microscopio a pequeños aumentos. Con un alfiler se separan los granos y se transportan a una gota de suero fisiológico y se observan al microscopio entre porta y cubreobjetos.

Diafragmando convenientemente, se observa muy bien, en el caso de una actinomicosis clásica, el aspecto moruliforme de los granos y en las partes más aplastadas pueden observarse los filamentos y los esporangios (mazas).

En otras actinomicosis se reconoce el aspecto que ha sido descrito para los granos, y, llegado el caso, se constatará su aspecto vermicular.

Si las fístulas contienen poco pus, habrá que extraerlo de zonas más profundas por lo que se utilizará una pipeta afilada y por aspiración se logrará extraer la cantidad necesaria para ser estudiada. Puede darse el caso de que en el trayecto de una fístula únicamente haya uno o dos granos, sobre todo en las lesiones incipientes.

2.° **Tinción de los granos del pus.** — Deben *extenderse* los granos sobre un portaobjetos previamente limpiado y desengrasado y ello se consigue aplastando moderadamente con otro portaobjetos. *Desecar* completamente a la estufa a 37° y *fijar* recubriendo con alcohol de 95° que se dejará evaporar.

La *tinción* más sencilla es el método del Gram para frotis. Hacemos pues, un *Gram-eosina*, dado que los filamentos son basófilos mientras que las mazas son fuertemente acidófilas.

Teñir durante algunos segundos con el violeta fenicado. *Lavar* rápidamente con agua corriente. Hacer actuar durante unos treinta segundos el *líquido de Lugol* (solución fuerte) que hará de *mordiente.*

Aguà destilada: 200 ml + yoduro potásico: 2 g + yodo: 1 g. *Lavar* rápidamente con agua corriente. *Diferenciar* con la mezcla alcohol-acetona: alcohol absoluto: 5 ml + acetona: 1 ml hasta que no haya emisión de corrientes violáceas. *Lavar* con agua corriente para detener la diferenciación y efectuar una tinción de contraste con la eosina W. G. al 1 %. Lavar, secar y observar en aceite de cedro.

■ Cortes de pus. — Pueden obtenerse cortes muy instructivos dejando caer gruesas gotas de pus en un fijador (líquidos de Bouin o en el Duboscq-Brasil) y seguidamente procesarlos como si se tratara de un fragmento de tejido u órgano.

3.° **Tinción de los granos a nivel de los cortes.** Se tratan los cortes obtenidos, tras la fijación de fragmentos de tumor procedentes de biopsias o de autopsias: estos fragmentos son incluidos a continuación en parafina y seccionados con el micrótomo, como si se tratara de un tejido, obteniéndose cortes seriados y delgados.

a) Gram-eosina. — Este método permite diferenciar bien los filamentos y las mazas (en el caso de que éstas existan). Se utiliza el método especial para cortes.

Teñir ligeramente los núcleos con *hemalumbre* de Mayer.

Lavar con agua corriente hasta que *vire*, adquiriendo una tonalidad azul violácea. En caso de tener que diferenciar para obtener una tinción nuclear más perfecta, debe usarse el alcohol clorhídrico. *Teñir* de 1 a 5 minutos con eosina W. G. al 1 %. *Lavar* con agua corriente. *Teñir* con violeta fenicada durante cinco a diez minutos *en frío. Lavar rápidamente* con agua corriente. Hacer actuar como *mordiente* el Lugol, durante cinco minutos. *Lavar rápidamente* con agua. Dejar un papel secante sobre los cortes para extraer el exceso de agua. *Diferenciar* y *deshidratar* con una mezcla a partes iguales de aceite de anilina y xilol. *Montar* con bálsamo. Si la deshidratación fuera insuficiente debe completarse utilizando el *xilol fenicado.*

El Gram-eosina es un método bastante delicado; debe tenerse una cierta práctica para que salga bien. Un procedimiento que da resultados tan interesantes como el anterior pero de más fácil aplicación es:

b) Método de Mann a base de eritrosina-azul de toluidina. — *Teñir* los cortes durante unos quince minutos con eritrosina al 0,1 % hasta que adquieran una tonalidad rosácea, sin sobreteñir, ya que en este caso el azul tendría dificultades en disponerse sobre los citoplasmas basófilos. *Lavar* con agua corriente. *Teñir* durante uno a diez minutos *sobre un portaobjetos* con el azul de toluidina en solución acuosa al 1 %. *Lavar* con agua corriente. *Diferenciar* con agua acética al 0,2 % hasta que las partes basófilas (núcleos, granos actino-micósicos, bacterias Gram-positivas) resalten bien sobre el fondo rosado. *Deshidratar* y montar con aceite de cedro.

Los filamentos quedan teñidos de color azul violáceo, las mazas quedan de color rojo anaranjado. Esta tinción es muy sólida y se conserva indefinidamente, mucho mejor que la doble tinción Gram-eosina.

Este método también puede utilizarse para la tinción de los granos.

4.° **Tinción de las mazas.** — Ya hemos indicado que las mazas no son del todo características de los microsifonados, se encuentran en diversos tipos de hongos y de bacterias (actinobacilo, *Aspergillus fumigatus*, bacilo tuberculoso, staphylococos, etc.).

El *Mann-biácido*, descrito anteriormente, tiñe admirablemente bien las mazas de color rojo claro y vivo y hace que resalten mucho en las preparaciones, incluso cuando se miran a muy pocos aumentos. Los dos métodos de Mann son muy adecuados para este tipo de estudios.

El *método de Curtis (safranina-negro naftol)* da también resultados óptimos: las mazas son de un hermoso color rojo, los filamentos o artejos cocciformes quedan azulados y destaca el conjunto sobre el fondo amarillento verdoso de la preparación.

Aparte de los dos métodos precedentes, indicaremos otra técnica que permite poner de manifiesto todas estas estructuras.

Teñir los núcleos y las mazas con la safranina-anilina durante diez a quince minutos. *Lavar* con agua corriente y escurrir cuidadosamente. *Teñir sobre portaobjetos* de diez a quince minutos por la siguiente mezcla, preparada en el momento de usar:

A. Solución saturada de ácido pícrico en agua destilada.

B. Agua destilada: 80 ml + glicerina: 20 g + negro de naftol B (o azul diamina 2B): 1 g.

Para el empleo deben mezclarse 9 partes de A con una parte de B. La solución B se conserva bien y puede prepararse con antelación.

Sin lavar con agua debe diferenciarse con alcohol absoluto hasta que no haya pérdida de coloración rojiza y que las mazas queden de color *rojo*, la colágena *azul* y destacan perfectamente bien sobre el fondo *amarillo verdoso* de la preparación.

Parar la diferenciación, sumergir la preparación en tolueno y montar.

Esta tinción se conserva indefinidamente.

Técnicas para las blastosporas (hongos levuriformes) y las artrosporas

1.º **Observación extemporánea de productos patológicos (esputos, excrementos, pus) y de cultivos.** — La técnica a seguir es una de las más sencillas y da preparaciones extraordinariamente nítidas. Se puede: 1.º *observar directamente, en fresco*, entre porta y cubreobjetos, diluyendo si fuera necesario con una gota de solución fisiológica; 2.º teñir el material sobre el portaobjetos con una gota de *Lugol* doble y observar entre porta y cubreobjetos; la tinción es instantánea y pone muy bien de manifiesto los enclaves de glucógeno.

Estas preparaciones no se conservan. Para obtener preparaciones permanentes deben hacerse extensiones o frotis sobre portaobjetos, desecarlos, fijarlos y teñirlos.

2.º **Elaboración, tinción y estudio de las extensiones.** — Este procedimiento es muy generalizado y se aplica para el estudio de todos los elementos levuriformes o bacteriformes, susceptibles de ser extendidos sobre portaobjetos y desecados instantáneamente. Si es necesario diluir o hacer una suspensión debe utilizarse agua destilada o agua de lluvia, que no deja ninguna traza tras su evaporación. Las *extensiones* de órganos por *aposición* serán simplemente desecados, fijados y teñidos. Los tiempos son los siguientes:

Extensión de una dilución o suspensión en la mínima cantidad de líquido posible. Se extiende describiendo círculos sobre el portaobjetos, con ayuda de una aguja de vidrio, hecha con una pipeta moderadamente estirada y cerrada a la llama. *Desecación*, cuanto más rápida mejor, primero en frío y agitando la preparación para acelerar la evaporación; después se deja a la estufa a 37º. *Fijación* recubriendo el portaobjetos con alcohol de 95º que se dejará evaporar. *Teñir* con uno de los métodos descritos anteriormente (Gram-eosina, Mann-biácido, Mann-eritrosina-azul de toluidina). Después de la tinción puede conservarse la preparación, en seco, protegida del polvo, o bien montada en bálsamo del Canadá o en aceite de cedro, según los casos.

Para observar las preparaciones conservadas en seco, basta recubrirlas con una gota de aceite de cedro en el caso de querer trabajar con el objetivo de inmersión homogénea, en caso de no utilizar el objetivo de inmersión se colocará un cubreobjetos sobre la gota.

3.º **Método del campo oscuro artificial, con tinta China o con nigrosina.** — El principio del método consiste en emulsionar los elementos a examinar en la tinta China o en la solución de nigrosina, extender y dejar secar. Las células destacan en claro sobre el fondo negro de la suspensión teñida. La tinta China debe ser preparada especialmente para bacteriología.

■ EXTENSIÓN. — Mezclar sobre el portaobjetos una gota de agua destilada (o de lluvia) filtrada y esterilizada, con una gota de tinta China. *Emulsionar* un poco de cultivo en la gota así preparada. Extender describiendo círculos sobre el portaobjetos con una pipeta estirada y cerrada a la llama, mezclando bien el medio de cultivo con la tinta China.

■ DESECACIÓN. — Primero en frío y agitando y después a la estufa a 37º.

■ OBSERVACIÓN. — Depositar sobre la mancha de tinta una gota de aceite de cedro y recubrir con el cubreobjetos. Observar con un potente objetivo, en seco o en inmersión homogénea.

Estas preparaciones se conservan indefinidamente, siendo posible obtener hermosas fotomicrografías y permiten apreciar con toda nitidez la forma y el contorno de las células, cuyas dimensiones son muy poco alteradas. La estructura interna, por el contrario, no puede observarse.

La *nigrosina* se emplea en solución acuosa del 5 al 10 %, según Deflandre. Se emulsiona el cultivo, como se ha indicado anteriormente, se extiende, se seca rápidamente y se observa con aceite de cedro con o sin cubreobjetos.

4.º **Tinción de las cápsulas.** — La cuestión de las *cápsulas* de los hongos levuriformes es todavía muy controvertida si bien ha sido considerada desde hace muchos años.

Efectivamente, son las que forman la denominada *goma de levadura* o *malla gelatinosa*. La *goma de levadura* ha sido obtenida en gran cantidad por Nägeli y Loew (1878) que lo conseguía por ebullición en agua y posteriormente por precipitaciones sucesivas por el acetato de plomo, el hidrógeno sulfurado y finalmente por el alcohol. De esta manera se han aislado diversos mucílagos

glucídicos que sobre todo se forman en gran cantidad al final de las fermentaciones.

Es E.-Chr. Hansen quien describió primero las *mallas gelatinosas* formadas por las cápsulas soldadas entre sí para formar una especie de colmena que aprisiona las células de la levadura. Estas mallas existen en los anillos y en los velos de los cultivos viejos. Hansen puso en evidencia las mallas tiñendo las células con el violeta de metilo, o bien tiñendo la malla, es decir, con un colorante de las cápsulas, o sea, de los mucílagos.

Hay pocos trabajos recientes sobre las cápsulas de las levaduras y en particular de las que tienen interés médico. Generalmente estos trabajos proceden del campo de la micología y se pierden en las hipótesis inmunológicas.

Para la tinción de estas cápsulas Negroni recomienda el *método de Hunton:*

■ Colorante de Hunton. — Fenol al 2 % (solución acuosa): 100 ml + ácido láctico puro de 0,25 a 0,50 ml + ácido acético al 1 %: 1 ml + solución alcohólica saturada de fucsina básica: 1 ml + fucsina fenicada envejecida: 1 ml.

Este método consiste en extender sobre el portaobjetos una emulsión del cultivo en *nutrosa* (caseinato de sodio) al 3 % esterilizado con vapor fluido y fenicado, en una proporción de 5 ml de fenol al 2 % por 100 ml de solución.

La extensión, desecada y no fijada se tiñe durante treinta segundos con el colorante de Hunton, después se lava, se seca y se observa.

Las células de la levadura se tiñen en *rojo* más o menos homogéneo, según su estado de juventud o de senilidad.

La cápsula teñida de color *rojo* y según Negroni está separada de la célula por un espacio claro. Frecuentemente se hincha, se fragmenta en hojas estratificadas o incluso termina por estallar.

Las imágenes dadas por Negroni no son demasiado convincentes. Su sustancia intercelular puede también corresponder a masas de colorantes, acumulados en los ángulos que forman los elementos prensados los unos contra los otros. Es quizá también la traza de una red gelatinosa de Hansen, descrita anteriormente, red formada por cápsulas confluentes.

En estos resultados es difícil poder discernir qué corresponde a la realidad y qué elementos pueden ser artefactos. En las investigaciones hechas con P. Guerra hemos preferido utilizar reactivos cuya acción hinchadora no sea tan grande.

■ Lugol-tinta China. — Hemos comprobado que el Lugol doble tiñe muy bien la cápsula en el caso de que ésta exista, también la hemos teñido con la fucsina fenicada de Ziehl, siguiendo el *método de Kufferath* diseñado para la tinción de ascosporas. *Diferenciar* a continuación, y rápidamente, con el ácido clorhídrico al 0,5 %. Lavar con agua, secar y aplicar tinta China; ésta hace resaltar muy bien las cápsulas incoloras y no deformadas. Butt, Bonynge y Joyce han estudiado la cápsula del estreptococo hemolítico con la tinta China diluida con glucosa al 6 % y con azoazul.

P. Borin para teñir las cápsulas microbianas ha utilizado el procedimiento de la tinta China, que le ha dado excelentes resultados. Sobre portaobjetos perfectamente desengrasados se extiende una capa muy delgada de cualquier suero y se seca al calor. Sobre uno de estos portaobjetos enfriado se mezcla una gota de tinta China con una gota del medio de cultivo líquido o de la emulsión obtenida del medio de cultivo sólido. Se extiende con el extremo de una afilada pipeta y se cubre el frotis, todavía húmedo, con xilol. Se decanta, y de una altura de un centímetro se hace caer una gota de aceite de cedro y se observan, sin poner previamente el cubreobjetos, los únicos gérmenes fijados sobre el portaobjetos por el suero.

F. Dosch tiñe las cápsulas bacterianas empleando la solución al 2,5 % de *prontosil*.

El *prontosil soluble,* fabricado por la I. G. Farben Industrie en Francia, recibe el nombre de *rubiazol*.

Las extensiones *no fijadas* se tiñen con esta solución durante diez minutos, posteriormente, *sin lavado* previo, se secan con papel de filtro. Los microorganismos, tanto los Gram-positivos como los negativos quedan teñidos de color rojo y rodeados por una aureola incolora, estrecha y bien delimitada. El conjunto se halla comprendido en una ancha zona teñida de color rojo. Según Dosch ésta correspondería a la cápsula de polisacáridos, mientras que la zona incolora representa el ectoplasma y la parte teñida correspondería al endoplasma.

La cápsula es extraordinariamente visible y frecuentemente muy desarrollada, sobre todo en estado parasitario, en los *Torulopsis*. Es por ello que es un buen material para empezar a estudiar los hongos levuriformes y familiarizarse con ellos. En el género *Candida* es mucho más delgada, difícil de observar y de aspecto variable según las cepas.

M. Gutstein de 1924 a 1925 redactó en cinco memorias un estudio muy completo de las cápsulas y ha dado un método general de tinción.

Desde 1920, R. Legroux y S. Magrou habían dado a conocer el estado organizado de las colonias bacterianas estudiando *cortes de colonias* fijadas con el alcohol formolado y teñidos con una mezcla de eosinatos de azul de metileno y de azul de toluidina tras su paso por *alcohol metílico*.

Eosinato de azul de metileno: 7 g + eosinato de azul de toluidina: 1,5 g + azul de toluidina: 0,5 g + alcohol metílico de 99,5°: 490 ml.

Hacer las operaciones en una caja de Laveran.

Cubrir el portaobjetos con 1 ml del colorante y al cabo de un minuto añadir 4 ml de agua destilada neutralizada. Girar el portaobjetos y dejar teñir con la extensión hacia abajo, durante diez a quince minutos. Lavar con agua corriente y diferenciar con tanino-naranja al cuarto, en agua destilada neutralizada, hasta que la gelosa adquiera una tonalidad azulada. Lavado con alcohol de 95°, paso por tolueno y montar en aceite de cedro.

En esta memoria se encuentran referencias e indicaciones sobre las partes mates, plegadas (fase R) que se desarrollan sobre las colonias lisas y húmedas (fase S), así como del *endoplasma* bacteriano (en violeta) y del *ectoplasma* (de color azul intenso).

Respecto a este último, que se ha identificado con la cápsula, R. Legroux (1925) da nuevos detalles para su puesta de manifiesto, bien sea a base de eosinatos, o simplemente tiñéndola con un colorante metacromático. Se extienden emulsiones del cultivo sobre medio sólido en un suero de mamífero extendido en 2 partes de agua corriente. Fijarlo húmedo con vapores de tetraóxido de osmio, dejar secar y teñir. Legroux insiste sobre la especial virulencia de las bacterias encapsuladas. Puede añadirse a este respecto, que *Candida albicans*, débilmente patógena, tiene únicamente una delgada cápsula, mientras que *Torulopsis neoformans*, muy patógena, está provista, en estado parasitario, de una cápsula muy gruesa con relación a las dimensiones de la levadura propiamente dicha.

Gutstein obtiene una tinción específica del ectoplasma cromófobo haciendo un previo tratamiento con tanino, el cual actúa como mordiente.

1. *Extensión* sobre portaobjetos del cultivo *sobre medios sólidos*, dado que con los medios líquidos se tiñe la abundante sustancia fundamental que se encuentra entre las células (es lo que probablemente le ocurrió a P. Negroni con el método de Hunton).

2. *Fijar* con calor. La fijación con una solución acuosa saturada de sulfato de magnesio o de amonio que hace aparecer el ectoplasma más grueso.

3. Hacer actuar de *mordiente* el tanino durante diez minutos con tanino al 5 %, después lavar a fondo.

4. *Teñir en frío*, durante quince a treinta segundos o un minuto, con un colorante básico en solución acuosa al 1 %. El calentamiento impediría la tinción limitada al ectoplasma. Si también se quiere teñir el endoplasma, debe hacerse actuar el colorante apropiado antes de la aplicación del mordiente.

Gutstein da para las levaduras los siguientes ejemplos:

1. *Tanino-safranina:* ectoplasma rosa, así como la pared de los ascosporos.

2. *Verde brillante fenicado, tanino, safranina.* Hacer actuar el verde brillante durante tres minutos, tratar con el mordiente y teñir durante treinta segundos con la safranina: ascosporos *verde claro*, endoplasma *verde azulado*, pared de los ascosporos y ectoplasma *rojo*. Puede sustituirse el verde brillante por el azul de metileno o la fucsina fenicada; en este caso el colorante del ectoplasma será entonces la safranina o el azul de metileno al 1 % no fenicado.

Para teñir diferencialmente los ascosporos y el endoplasma, debe dejarse actuar un colorante fenicado y después diferenciar con ácido acético:

3. *Violeta fenicado, ácido acéticq, verde brillante, tanino, safranina.* — Dejar actuar el violeta durante un minuto *en caliente;* diferenciar con ácido acético al 5 % durante cinco minutos; teñir *en frío* durante 3 minutos con el verde brillante no fenicado; tratar con el mordiente y finalmente teñir de quince a treinta segundos con la safranina. Los ascosporos: *violetas,* endoplasma: *verde azulado*, cápsulas y ectoplasma: *rojos*.

4. *Violeta fenicado, ácido acético, azul de metileno, fosfina, tanino, safranina.* — Teñir durante diez minutos y *en caliente* con el violeta fenicado y diferenciar durante cinco minutos con el ácido acético; teñir dos minutos *en frío* con el azul de metileno y después un minuto, minuto y medio con la fosfina, hacer actuar el mordiente y después teñir como en el caso anterior, con la safranina. Ascosporos, *violetas*; su cápsula y el ectoplasma, *rojos*.

5. *Azul fenicado, fosfina, tanino, safranina.* — Procedimiento muy sencillo que da los ascosporos de color *azul*, el endoplasma, *amarillo* y las cápsulas y el ectoplasma *rojos*.

Para preparar el violeta fenicado, Gutstein aconseja el empleo del violeta de metilo N azul (Agfa) que es una mezcla tetra, penta y hexametilpararrosanilina.

Gutstein, en su análisis del ectoplasma de las levaduras, ha llegado más lejos y ha indicado que está formado por dos capas: una interna, gruesa, bien delimitada, y una externa, muy delicada y que forma un anillo poco definido. Estos detalles morfológicos pueden ponerse de manifiesto por los siguientes métodos:

6. *Tanino-verde de Guinea.* — Hacer actuar el tanino al 30 % como mordiente, lavar profundamente y teñir durante uno o dos minutos con el verde de Guinea al 1 %. La parte interna del ectoplasma se tiñe de color *verde oscuro* y el resto en *verde claro*.

7. *Fosfina fenicada-verde de Guinea.* — Teñir durante cinco minutos con la fosfina fenicada (un poco de agua fenicada al 5 % en fosfina al 1 %). Lavar y teñir seguidamente durante quince a treinta segundos con el verde de Guinea. Endoplasma *amarillo*, ectoplasma *verde*, esta doble tinción se consigue sin emplear ningún agente del tipo de los mordientes.

8. *Ferrocianuro, azul Victoria, tanino, safranina.* — Este método permite teñir las dos capas que constituyen el ectoplasma con dos colores contrastados. Tratar durante cinco minutos con el ferrocianuro potásico (prusiato amarillo) del 2 al 10 %, las extensiones previamente fijadas por el calor; lavar a fondo y después teñir durante dos o tres minutos con el azul Victoria al 1 %; lavar nuevamente y hacer actuar como mordiente el tanino al 3 % durante cinco minutos. Lavar y teñir unos quince segundos con la safranina.

Esta estructura del ectoplasma de bacterias y de levaduras, permite dar una base morfológica a las hipótesis inmunológicas. Gutstein ha reconocido entre otros hechos, que la propiedad que tienen algunos microorganismos de teñirse con el Gram está relacionada con la presencia, en su ectoplasma (cápsula) de un lipoide ácido. Según Gutstein, el ectolipoide de las levaduras es un fosfátido, posiblemente una lecitina.

5.º **Tinción de los ascosporos.** — Hay dos procedimientos que permiten reconocer los ascosporos con toda certeza:

■ OBSERVACIÓN DIRECTA EN EL LUGOL DOBLE y a muy grandes aumentos, pero esta técnica requiere un observador experto. Ha dado excelentes resultados a los micólogos del Bureau Central de Baarn (Holanda) y les ha permitido diferenciar los ascos y los ascosporos en cultivos de cepas que durante mucho tiempo se habían considerado anascosporos.

■ TINCIÓN SELECTIVA CON EL MÉTODO DE KUFFERATH. — Este método se basa en una propiedad particular de la membrana de los ascosporos maduros. Esta pared tiene una parte acidófila y otra ácida y alcoholorresistente.

La acidofilia de los ascosporos maduros es una propiedad muy generalizada en toda la clase de los Ascomicetos. También el Mann biácido es un excelente colorante para teñir los cortes de los apotecios y peritecios: los ascosporos maduros se tiñen selectivamente de *rojo* intenso, altamente luminoso.

a) *Emulsionar* sobre un portaobjetos, en una gota de agua destilada filtrada y esterilizada, una pequeña parte de la colonia que se desea observar.

b) *Desecación y fijación.* — Calentar el portaobjetos sobre la llama o sobre una platina calefactora y extender la emulsión con el extremo de la pipeta.

Es indispensable continuar con la extensión hasta que la gota termine de secarse, con la finalidad de asegurar una dispersión lo más uniforme posible de las células de la levadura.

Este calentamiento, que puede llegar hasta la ebullición, no altera en absoluto la forma ni el aspecto de los ascos ni de los ascosporos que ya están fijados.

c) *Tinción con la fucsina fenicada de Ziehl* por ebullición, pero teniendo la precaución de que la capa superficial de la preparación no llegue a secarse.

d) Dejar *enfriar* y después *lavar* con agua corriente y *limpiar* los bordes de la preparación.

e) *Diferenciación.* — Sumergir el portaobjetos durante algunos segundos en alcohol clorhídrico al 1 % o mejor en alcohol láctico al 2 %. *Frenar* la diferenciación con un profundo lavado en agua. El tiempo de la diferenciación varía, atendiendo a la especie estudiada y atendiendo al grado de madurez de los ascosporos.

f) *Tinción de contraste* dejando actuar durante treinta segundos el *azul de Nilo* (clorhidrato) al 1 %.

g) *Lavar* con agua destilada, *escurrir* sin secar completamente y extender sobre la preparación una gota de tinta China diluida.

h) *Secar* y montar con bálsamo.

Resultado. — Los ascosporos maduros quedan teñidos de color *rojo intenso;* los ascos y las blastosporas, de color *azul verdoso pálido;* el conjunto es muy visible sobre el fondo negro proporcionado por la tinta China. El azul de Nilo es el único colorante de la gama de los azules que no se decolora con la tinta China.

Técnicas para los dermatófitos o para los hongos de las tiñas

Como todos recordarán las tiñas son micosis de la epidermis córnea, por lo cual hay tiñas de cabellos, de pelos, de epidermis y de uñas. Para el estudio de las tiñas habrá pues que extraer una u otra de estas epidermis queratinizadas y buscar los hongos.

El estudio de cabellos y pelos deberá basarse en la noción dada por Sabouraud que indica que la infección es *descendente.* En la fase de formación de una placa de tiña, los artrosporos, caídos sobre el cuero cabelludo, invaden inicialmente la epidermis sobre la que dan pequeños talos con crecimiento periférico, siguiendo el modelo normal para estos hongos. Cuando los filamentos de estos talos encuentran el orificio del folículo piloso se introducen en él, siguiendo el infundíbulo. Una vez sobrepasado el estrato córneo de la piel, se introducen en el pelo que está queratinizado hasta el nivel del bulbo, el cabello arrastra consigo el hongo, pero el crecimiento de éste no cesa y prosigue en dirección al bulbo piloso y da lugar a la franja de Adamson, y únicamente se para en la zona donde se inicia la queratinización.

¿Por qué recordamos estas cuestiones banales, aunque a veces desconocidas? Es para señalar que el cabello o el pelo debe ser *arrancado* y *no*

cortado, dado que interesa estudiar toda la parte parasitada, que sobre todo se halla a nivel intrafolicular.

En las tiñas tricofíticas, el cabello parasitado está cortado casi a nivel del folículo, dado que al estar invadido de artrosporos desarticulados y móviles se ha vuelto quebradizo. En las tiñas microspóricas se rompe un poco más largo, dado que está sostenido por la vaina o envoltura formada por los artrosporos. El cabello fávico no se rompe a pesar de estar parasitado en toda su extensión, pero únicamente han penetrado filamentos muertos; la parte viva del hongo se encuentra en el cuello del bulbo piloso, a nivel de la franja de Adamson.

Al igual que en cualquier otro tipo de estudio microscópico, el éxito de la investigación de los dermatófitos de cabellos y pelos depende en gran parte de la manera como se consiguen las muestras.

1.º **Obtención de las muestras.** — *a)* CABELLOS Y PELOS. — Deben ser *arrancados* con *pinzas de depilar*, apretando fuertemente, sin miedo de hacer sangrar, la epidermis del cuero cabelludo más o menos repleta de escamas. En las tiñas tricofíticas, sobre todo en la *esquilada peladoide*, debe insistirse para obtener cabellos parasitados, ya que están reducidos a puntos negros o contorneados en forma de S o de Z y localizados en las escamas.

El cabello o el pelo parasitado se arranca con cierta facilidad y deben obtenerse con su correspondiente bulbo.

b) ESCAMAS. — Se obtienen las escamas, bien sea levantándolas y arrancándolas con una pinza delgada, o bien raspando la epidermis con un vaccinostilo y dejando caer las escamas sobre un portaobjetos.

c) TIÑAS DE LA PIEL LAMPIÑA. — Como he señalado anteriormente, estas tiñas son en realidad micosis de las partes cutáneas, donde hay escasez de pelos. También S. Milochevitch ha trabajado sobre esta cuestión, y ha facilitado y mejorado su diagnóstico demostrando que bastaba buscar los pelos normales (no el vello) existente sobre la lesión y observarlos como se hace con el cabello, después de haberlos arrancado con unas pinzas.

2.º **Conservación.** — Los cabellos, pelos y escamas parasitados conseguidos de esta manera pueden conservarse entre dos portaobjetos llameados, envueltos por papel de filtro.

3.º **Observación.** — El mejor reactivo para la observación de este material es el *cloro-lactofenol de Amann*, cuya acción clarificante e hinchadora es superior a la del lactofenol (ver p. 117).

La técnica es una de las más sencillas: depositar los cabellos o el pelo, dotado a ser posible de su bulbo, en una gota del reactivo sobre un portaobjetos y cubrir con el cubreobjetos. Calentar ligeramente, hasta que aparezcan burbujas, pero sin hacer hervir, y obsérvese al microscopio.

Si el cabello es muy pigmentado habrá que cerrar el diafragma, de lo contrario los elementos micélicos no se distinguirían con la gran luminosidad que se tendría.

El aspecto microscópico de los diversos tipos de tiña se encontrarán en obras de dermatología y de parasitología.

■ MÉTODO CLÁSICO. — Para las personas rutinarias indicaremos a continuación el antiguo método clásico de la *potasa cáustica*. Preparar con antelación una pequeña cantidad de una solución de potasa cáustica al 30 % (70 ml de agua, pastillas de potasa 30 g). Debe recordarse que la potasa se carbonata rápidamente, de ahí que sea conveniente preparar poco y a menudo.

Colocar el cabello o la escama entre porta y cubreobjetos, en una gota de esta solución, *calentar con precaución* hasta que aparezcan burbujas (si se comete la imprudencia de dejar hervir, el operador puede ser herido por proyecciones del líquido cáustico).

Observar la preparación previa limpieza de los extremos con papel de filtro. Diafragmar considerablemente.

El método de la potasa ya no tiene interés, dado que presenta una serie de inconvenientes.

a) El cabello queda demasiado blando, se disocia y difícilmente se aprecian las relaciones existentes entre el hongo y el cabello.

b) En el caso del cabello fávico, la potasa hace salir de los filamentos muertos gran cantidad de burbujas de aire que enmascaran el campo de observación. Hay que reconocer que estas burbujas han sido, y quizá todavía lo sean, consideradas como características para los dermatólogos, pero es un carácter más clínico que micológico.

c) Las preparaciones con potasa no pueden conservarse y difícilmente pueden convertirse en preparaciones permanentes.

d) La utilización de la potasa es uno de los factores que producen la imagen artefactual de los denominados hongos en mosaico *(mosaic fungi)*, fuente de errores de diagnóstico.

e) Los únicos casos en que este método pueda todavía prestar servicios es para disociar los granos de los micetomas, bien sea los nódulos piédricos, demasiado duros y gruesos para poder ablandarse y de esta manera podrán ser aclarados, transparentados con el cloral-lactofenol.

■ GAIACOL. — O. Machado ha aconsejado utilizar el gaiacol como aclarante, en frío. Su acción es casi instantánea. Las preparaciones pueden montarse directamente en bálsamo del Canadá.

4.º **Preparaciones permanentes.** — Ningún método permite conservar las preparaciones montadas con el cloral-lactofenol con sus cualidades de brillantez y claridad.

Sin embargo, en el caso de querer disponer de una colección pueden obtenerse resultados satisfactorios al montar con *goma de cloral* (ver página 176) y también con el *líquido amoniacal azucarado* de R. du Noyer.

Dejar actuar durante quince minutos y en frío sobre los pelos o escamas el líquido siguiente:

Azúcar: 10 g + amoníaco: 40 ml + agua destilada hasta completar los 100 ml.

Tras los quince minutos, calentar lentamente sobre el portaobjetos o en una cápsula de porcelana hasta que desaparezca el olor a amoníaco. Que no se evapore más de una tercera parte y montar en un líquido de consistencia de jarabe.

VI. — OBSERVACIONES COMPLEMENTARIAS

OBSERVACIONES SOBRE LAS TÉCNICAS ELIMINADAS

No hemos querido sobrecargar la presente obra con técnicas equivalentes o sinónimas, con variantes a las técnicas básicas, con técnicas excesivamente especializadas, ni con técnicas que consideramos caducas, bien sea por el hecho de que en su constitución intervienen productos que ya no se fabrican, o bien porque sus resultados son excesivamente aleatorios, o no tan buenos como los obtenidos con los métodos que hemos propuesto.

Algunos nombres de colorantes no figuran en esta obra, aunque se usen habitualmente. No hemos suprimido dichos colorantes, pero nuestra constante preocupación para reducir las sinonimias ha hecho que únicamente escogiéramos una de sus denominaciones, por lo que remitimos al lector a nuestra lista de sinonimias que aparece en la página 194.

Determinados nombres de autores ya no aparecen encabezando técnicas bien conocidas y ello puede ser debido al hecho que después de haber efectuado un minucioso análisis bibliográfico hemos comprobado que no tenían prioridad en el uso del método en cuestión, o bien hemos decidido suprimir el nombre por cuestiones de ambigüedad. Los grandes autores como Apathy, Feulgen, Heindenhain, y otros muchos, han ideado más de un método que puede llevar su nombre, métodos siempre válidos y que lo serán todavía durante mucho tiempo, pero si tenemos la mala costumbre de hablar por ejemplo de la reacción de Feulgen no sabremos nunca que se trata de la reacción plasmática o de la nuclear, ambas debidas al mismo autor.

Nos ha parecido también importante adoptar este criterio debido a la excesiva proliferación de nombres de autores encabezando técnicas o variantes de técnicas, tentados siempre por un natural narcisismo o empujados por la inflación papirogénica de marcar su patrimonio a un pretendido nuevo método, cuando en realidad, tras un análisis crítico, se revela que únicamente hay modificaciones de tiempo o de concentración de los reactivos o, simplemente, que se trata de la adición de un nuevo componente, y que en realidad no influyen sobre los resultados como ya Gabe señaló en su momento.

Sin embargo, no suscribimos del todo la segunda conclusión a que llegó Gabe, de reducir su índice bibliográfico al mínimo. Si bien nos parece contraproducente arrastrar el peso muerto de determinados nombres en las denominaciones de las técnicas, nos parece interesante y esencial que se puedan encontrar las referencias bibliográficas de la publicación o publicaciones que permitan al lector comprobar, personalmente, los diversos métodos y constatar eventualmente nuestra elección. Una auténtica elección presupone una información cuanto más exhaustiva mejor, y todos tienen no solamente el derecho sino el deber de cuestionarse periódicamente si el método escogido es el mejor para el material que está estudiando.

AUTOMATIZACIÓN DE LA FIJACIÓN-IMPREGNACIÓN-TINCIÓN

Los grandes centros hospitalarios están obligados a procesar grandes cantidades de muestras al día. En muchos casos lo que interesa es obtener un resultado rápido: una biopsia en el transcurso de una operación, la estandarización de un método y por consiguiente su automatización. Los métodos rápidos recomendados para el estudio de las biopsias ya han sido estudiados anteriormente (pág. 35). Los sistemas automatizados tienen numerosas ventajas y algunos inconvenientes; tienen la ventaja de hacernos reflexionar sobre el relativo interés de los tiempos y concentraciones, así como del nombre de los autores que van aso-

ciados a ellos; dado que en la mayoría de los sistemas automatizados los tiempos no pueden variarse al pasar de un baño a otro; el operador debe adaptar su método alargando determinados tiempos y acortando otros. Para alargar un tiempo generalmente debemos diluir previamente el reactivo e, inversamente, aumentar la concentración cuando se acorta el tiempo. Los tiempos intermedios de decantación y escurrimiento generalmente quedan suprimidos, por lo que los líquidos de los baños deberán cambiarse frecuentemente ya que quedan fácilmente contaminados por los reactivos que embeben los cortes.

Algunos sistemas automatizados tratan uno o varios portaobjetos durante algunos minutos o durante unas horas, atendiendo a si se trata de un método tricrómico simple o de un panóptico complicado, como pueda ser el Papanicolaou; otros son programados para funcionar durante la noche. En todos los casos, se impone hacer una adaptación de los métodos habitualmente utilizados. Las casas comerciales ofrecen múltiples explicaciones al respecto.

Se tendrá siempre la precaución de instalar estos autómatas en una habitación especial, perfectamente ventilada, dado que algunos disolventes utilizados son peligrosos si se respiran con frecuencia y casi todos son inflamables.

Generalmente es preferible disponer de varios aparatos automatizados, uno para la fijación, deshidratación e inclusión, otro para la tinción de las extensiones y un tercero para la tinción de los cortes adheridos sobre los portaobjetos.

CONFECCIÓN DE GRANDES SERIES PARA LA ENSEÑANZA

Si bien los autómatas de fijación-deshidratación-tinción permiten una ganancia de tiempo muy importante en la confección de las grandes series, todavía no se ha conseguido automatizar el piramidado de los bloques, ni la adhesión de los cortes ni su montaje. Sin embargo, varios autores han tratado de facilitar y agilizar estas operaciones sin que pueda hablarse de una automatización.

Algunos micrótomos se han automatizado: un motor de velocidad regulable, avanza y corta; pero estos aparatos no deben dejarse sin vigilancia, debe controlarse en todo momento el desarrollo de estas operaciones; la motorización tiene sobre todo la finalidad de regularizar las operaciones.

Adhesión de los cortes seriados sobre hojas cortables. — Únicamente la mica resiste todos los tratamientos químicos a que se someten los materiales objeto de nuestro estudio y que han sido descritos en este Manual. Todavía no se conocen plásticos que puedan soportar, sin estropearse ni teñirse, todos estos tratamientos. Sin embargo, en ciertos casos, las resinas «policarbonatadas» pueden ir bien. Se efectuarán ensayos para seleccionarlas. Los cortes seriados se extenderán y engancharán sobre grandes hojas que tras la tinción se recortarán y cada fragmento se tratará como si fuese un portaobjetos de vidrio para las siguientes operaciones y finalmente enganchado sobre el portaobjetos de vidrio.

Pegado, colodionaje y peliculado. — Se trabaja sobre grandes planchas de vidrio esmerilado, extremadamente limpias; se extienden los cortes sobre una solución diluida de jarabe de azúcar vertida sobre una placa de vidrio; se seca a 60°; se desparafina mediante dos baños de benceno, se elimina el benceno con tres baños de etanol absoluto; se tira colodión al 5 % sobre la placa de vidrio y se extiende uniformemente; se escurre y se deja secar; debe endurecerse con etanol de 70°. Se corta el colodión por tres de los cuatro lados, cerca del borde de la placa; se sumerge en el agua para disolver el azúcar; la película de colodión portadora de los cortes flota sobre el agua pero queda retenida sobre el vidrio por uno de los lados, lo que permitirá trasladar los cortes de uno a otro reactivo del procesado.

Deshidratar con etanol de 95°; recortar con tijeras y montar.

ALEX

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

6/
TINCIONES CITOLÓGICAS SIN ESPECIFICIDAD CITOQUÍMICA

I. — CITOLOGÍA GENERAL

Puede definirse la Citología más bien por el tamaño de las estructuras a estudiar que por su naturaleza, dado que histólogos y citólogos se interesan por los mismos temas.

La fijación citológica. — Esta etapa requiere una particular atención, ya que es evidente que cuanto más se pretenda estudiar estructuras delicadas más cuidadosa tiene que ser la fijación. En la página 127 hemos reunido los mejores fijadores citológicos.

Si la tolerancia en lo que hace referencia a la demora de la fijación es más grande, en razón de la pequeñez de las piezas más fáciles de ser penetradas; se debe fijar lo antes posible, enseguida después de haber hecho la extracción de la pieza. Una vez fijada conviene seguir el procesamiento.

Tinciones regresivas con lacas de hematoxilina. Hemos visto en la página 221 que las lacas progresivas de hematoxilina constituyen uno de los métodos de elección de la coloración de núcleos para la histología. Para el citólogo el principio progresivo del método es inverso, se hace regresivo y se practica sobre cortes muy delgados, de menos de 5 μm.

Lacas férricas de hematoxilina. — Preparar extemporáneamente: **A)** Solución acuosa al 5 % de alumbre férrico amoniacal. **B)** Solución madre de hematoxilina al 10 % en etanol de 96°, madurada durante dos meses como mínimo, la solución se conserva hasta 10 años. En el momento de utilizar se diluye la solución madre de la siguiente manera:

Fórmula de Heindenhain. Solución madre: 5 ml en 95 ml de agua destilada.

Fórmula de Regaud. — Solución madre: 10 ml + glicerina: 10 ml + agua: 80 ml.

Dejar actuar el mordiente durante 24 h a temperatura ambiente en la solución **A**; lavar con agua destilada; tratar 24 h en la solución **B** diluida según una de las dos fórmulas; lavar 5 min con agua del grifo; diferenciar bajo el microscopio con la solución **A**; frenar la diferenciación por un lavado en agua del grifo; prolongar este lavado durante 30 min. Puede hacerse una tinción de contraste; deshidratar y montar.

Debe señalarse que la tonalidad obtenida «sube» un poco durante este último lavado.

Tiñe los núcleos, el ergastoplasma, los granos de secreción, los cilios, la infraciliatura, los centrosomas, el huso acromático. Tras la poscromización las mitocondrias que forman el condrioma, la colágena, las fibras musculares estriadas, las inclusiones metálicas, las sustancias mucosas muy ácidas también se tiñen.

Tricrómico de Prenant. — Teñir durante 10 minutos en una solución acuosa al 1 % de eritrosina azulada o de eosina amarillenta; lavar; dejar 24 h en alumbre férrico acuoso al 5 % que actúa de mordiente; lavar; teñir durante 24 h en una solución de hematoxilina, sea la de Heidenhain o la de Regaud; lavar con agua corriente; diferenciar al microscopio con la solución de alumbre férrico al 5 %; lavar con agua corriente; teñir rápidamente sobre portaobjetos con una solución acuosa al 0,5 % de verde luz en etanol de 50°; seguir el proceso tintorial al microscopio y parar cuando la tonalidad adquirida sea grisácea; aclarar y montar.

La colágena, las mucinas, los granos de secreción quedan *verdes*; las estructuras sideróﬁlas, *negras*; el fondo citoplasmático queda *rojo*.

Tricrómico de Gabe. — Preparar: eosina amarillenta: 1 g + verde luz: 0,2 g + ácido fosfotúngstico: 0,5 g + ácido acético: 0,5 ml; teñir con una laca progresiva de hematoxilina; lavar; teñir de 5 a 10 min con la solución anterior; escurrir; deshidratar y montar.

Los núcleos quedan *negros*; el citoplasma, de *rojo* a *verde* pasando por *gris*; los granos de secreción, *rojos* o *verdes*; mucina y colágena, *verdes*, y las fibras elásticas quedan *incoloras*.

Laca cúprica de hematoxilina. — Preparar: **A)** solución acuosa saturada de acetato de cobre. **B)** solución acuosa al 5 % de cromato de K. **C)** solución acuosa al 1 % de hematoxilina preparada a partir de la solución madre madurada. **D)** Bórax: 5 g + ferricianuro K: 5 g + agua: 600 ml; conservar en frío.

Dejar actuar durante 5 min el mordiente **A**; lavar; tratar durante 1 min con **B**, lavar y teñir durante 1 min en **C**; lavar; volver a pasar por **A** durante 10 segundos, diferenciar al microscopio con **C** (o con **C** diluido si la regresión es demasiado rápida); lavar durante 1 h; deshidratar y montar.

Núcleos, *azules*; el resto queda como cuando se aplica la laca férrica.

Coloraciones del núcleo y de sus estructuras. — Se puede proceder a la tinción vital, al contraste de

fases o al contraste interferencial. Se recomienda comprimir suavemente la célula a fin de que los orgánulos citoplasmáticos queden bien visibles. El mejor sistema de compresión es el de los geles de gelosa o de gelatina: se preparan con cierta antelación portaobjetos bien limpios que se sumergen en una solución fresca de gelosa al 0,1 %, se escurre y se deja secar protegiéndolos del polvo. Estos portaobjetos son seguidamente utilizados como portaobjetos normales, para montar entre porta y cubreobjetos, en agua o en suero fisiológico, o en su medio natural. La gelosa al hincharse absorbe agua y reduce progresivamente el espacio disponible por las células que quedan comprimidas contra el cubreobjetos en la mejor posición posible para la observación, según Bessis y Locquin.

Puede *teñirse vitalmente* el núcleo mediante un examen *fluoroscópico* por una solución acuosa al 0,01 % de naranja de acridina tamponada a pH: 7,7; teñir durante 4 minutos; lavar con suero fisiológico; observar excitando con luz U.V. o azul; los núcleos en vivo son *verdes*; los núcleos muertos son *pardo-rojizos*.

Tinciones de los núcleos sobre extensión. — Escoger una de las siguientes técnicas, o algunas de las expuestas anteriormente:

Método de la safranina-verde luz. — Preparar: **A)** Safranina: 1 g + etanol absoluto: 100 ml, tras la disolución añadir 50 ml de agua. **B)** Ácido pícrico en solución acuosa saturada. **C)** Verde luz: 0,2 g + ácido acético: 0,5 ml + agua: 100 ml.

Teñir durante 10 minutos con **A**; lavar con agua y después con alcohol de 96°; diferenciar con **B** y tinción de contraste con **C** (15 segundos a 1 minuto); deshidratar y montar.

Método del cristal violeta. — Teñir durante 10 minutos con una solución de cristal violeta preparada de la siguiente manera: agua anilina: 100 ml + solución saturada de cristal violeta en etanol de 96°: 10 ml; lavar; tratar durante 1 minuto con Lugol débil; lavar con etanol de 96° hasta que cese la emisión de nubes violeta; deshidratar y montar.

Preparación y tinción de los cariotipos. — Se obtienen por aplastamiento tras un tratamiento previo destinado a aumentar el número de mitosis y a facilitar la separación de células. Se aconseja un *paso rápido* por el citrato sódico al 0,37 %.

El aplastamiento puede hacerse directamente en una gota de orceína acética: disolver 2 g de orceína en 45 ml de ácido acético calentado a 60°; una vez enfriado completar con ácido acético hasta los 100 ml. Colocar el material en una gota de orceína acética sobre un portaobjetos albuminado; poner seguidamente el cubreobjetos muy ligeramente vaselinado; recubrir con un papel y apretar para aplastar, sin que haya desplazamiento lateral. Puede procederse seguidamente a la observación directa o bien sumergir el conjunto en etanol de 70° para hacer caer el cubreobjetos y teñir con hemalumbre o con el Feulgen-Rossenbeck: reacción nuclear.

Determinación de la cromatina sexual femenina. La cromatina sexual femenina, concentrada únicamente en los cromosomas X es en ocasiones heterocromática: se tiñe diferentemente de los restantes cromosomas, generalmente de tonalidad mucho más oscura; es quizá la mejor prueba de la persistencia filogenética de la simbiosis heterotáxica que ha dado lugar a la sexualidad hace más de 900 millones de años, según la tesis de Locquin (1977). Se utilizarán para visualizarlos todas las reacciones nucleares después de una hidrólisis con ácido clorhídrico 5 N durante 20 minutos.

Tinción del nucléolo y del nucleonema. — Es muy visible en contraste de fases y en contraste interferencial. Es fuertemente basófilo, por lo que se tiñe con todos los colorantes de los ácidos ribonucleicos: gallocianina, pironina, etc. Puede impregnarse con plata o visualizar los más finos detalles con el **método de pirogalol-férrico**, que tiñe igualmente el «nucleonema».

Impregnar con una solución acuosa al 3 % de alumbre férrico; lavar; tratar con una solución acuosa al 1 % de ferricianuro K; después de 30 segundos añadir diez gotas en el tubo, conteniendo una solución acuosa al 2 % de pirogalol; lavar seguidamente con agua corriente; deshidratar y montar. Teñir con *azul-negruzco* del nucleonema.

Tinción de los dictiosomas o cuerpos de Golgi. — Pueden observarse vitalmente en contraste de fases o en contraste interferencial; se tiñen, pero no selectivamente, con ciertos colorantes vitales.

Impregnación ósmica. — Fijar con un líquido cromoósmico; lavar largamente con agua corriente; impregnar en la estufa a 37° con una solución acuosa al 1 % de tetraóxido de osmio; renovar la solución cuando ésta haya adquirido una tonalidad pardusca; debe dejarse de 4 a 9 días hasta que los dictiosomas hayan quedado totalmente impregnados de negro y haya decoloración de lípidos; lavar; deshidratar; pasar por esencia de cedro; incluir en parafina y cortar. *Atención:* el objeto se ha vuelto quebradizo; desparafinar, hidratar, tinción de contraste; deshidratar y montar.

Si después de la impregnación ha quedado el fondo excesivamente teñido deberá procederse a un blanqueado con permanganato potásico al

0,1 % o con agua oxigenada, en una proporción de cinco gotas por 100 ml de agua.

Impregnación argéntica (según Elftman). — Fijar en la oscuridad durante 2 horas con formol neutro: 10 ml + agua: 90 ml + nitrato de plata: 2 g. Lavar rápidamente con agua destilada, reducir durante 2 horas, en la oscuridad, con formol neutro: 15 ml + agua: 85 ml + hidroquinona: 2 g. Lavar con agua del grifo y pasar por formol al 10 % durante 12 horas. Deshidratar, incluir y cortar. Desparafinar, hidratar, tinción de contraste facultativa; deshidratar y montar.

Tinción del condrioma. — La observación vital puede hacerse con el contraste de fases o con el contraste interferencial; también puede *teñirse vitalmente* con el verde Janus, para ello se procederá de la siguiente manera: untar previamente el portaobjetos como se procede al hacer una extensión, con una capa delgada de la siguiente solución: etanol de 96°: 1 ml + solución al 0,1 % de verde Janus en etanol de 96°: 1 ml + solución al 0,5 % de rojo neutro en etanol de 96°: 1 ml. Depositar las células en una gota de solución fisiológica, poner un cubreobjetos y cementar con vaselina para evitar la evaporación. El condrioma: condriomitos y condriocontes quedan *verdes*; las vacuolas, *rojas*.

Fijación, previa tinción. — Tras una rápida extracción de la muestra, si se quiere conservar el condrioma, deberá hacerse una cuidadosa fijación.

Deberán evitarse los fijadores que contengan ácido acético o tricloroacético. Los fijadores a base de dicromato K y de formol son adecuados. Los fijadores cromosómicos, sin ácido acético, también van bien cuando las piezas son de pequeño tamaño. En cualquier caso, después de la fijación se procederá a hacer un cuidadoso lavado con agua corriente. Si el fijador carece de osmio habrá que «poscromizar», es decir, completar la fijación con la actuación de un mordiente. Preferentemente se han utilizado mordientes exclusivamente a base de sales de cromo: dicromato al 3 % en solución acuosa. Actualmente, se sabe que es preferible utilizar mezclas acetomercúricas cuando se ha fijado con formol salino o azucarado, o cálcico. Dejar que las piezas permanezcan un tiempo igual al de la fijación en agua: 100 ml + ácido acético: 0,1 ml + acetato mercúrico: 3 g. Si debe descalcificarse el material habrá que hacerlo después de la poscromización.

Las tinciones mitocondriales deben hacerse sobre cortes de menos de 5 µm, lo más regulares posibles y previamente coloidonados. Introducir los cortes pegados sobre el portaobjetos, después del desparafinado, en una solución de colodión del 0,1 % en la mezcla a partes iguales de alcohol-éter; después de dos minutos sacarlas lentamente de este baño y dejarlas secar verticalmente; cuando están medio secas (todavía son reflectantes al incidir la luz sobre ellas) se sumergirán en etanol formolado al 10 %, a fin de endurecerlos.

Tinción con la rosanilina ácida trisulfonada (según Altmann). — Preparar agua de anilina, dejando en contacto varios meses el agua con aceite de anilina al 3 %, agitando periódicamente para emulsionar el aceite en el agua y disolver en el momento de usar un 20 % de rosanilina ácida sulfonada. Teñir en caliente con este reactivo colocando una gran gota del colorante sobre el portaobjetos y colocando éste sobre una platina calefactora hasta que haya emisión de vapores y dejando actuar durante cinco minutos. No permitir que hierva ni que se seque; dejar enfriar y lavar enérgicamente con un chorro de agua destilada, proseguir la tinción con uno de los siguientes métodos policrómicos.

Azul de toluidina-aurantia. — Teñir con una solución acuosa al 0,5 % en azul de toluidina; diferenciar con una solución saturada de aurantia en etanol de 70°; lavar; deshidratar; montar (Kull, 1913).

Ácido pícrico-verde luz. — Diferenciar con etanol de 96° saturado de ácido pícrico; lavar con etanol de 70°; tinción de contraste con una solución acuosa al 0,2 % de verde luz (Benoît, 1925).

Picrato de verde de metilo. — Deshidratar con el etanol absoluto; teñir con una solución saturada de picrato de verde de metilo en metanol; añadir sobre el portaobjetos una gota de agua, mézclese bien; dejar actuar durante 30 segundos; lavar; deshidratar y montar.

Todas las diferenciaciones deben controlarse al microscopio.

Se prepara el picrato de verde de metilo mezclando a partes iguales una solución acuosa saturada de ácido pícrico y una solución acuosa al 1 % de verde de metilo; filtrar; lavar; secar a la estufa a 37°.

El condrioma queda de color *rojo intenso*; la cromatina, *verde;* los nucléolos, *rojos* o *verdes*; el citoplasma basófilo, *verde;* el acidófilo, *amarillo*; los labrocitos, la sustancia fundamental del cartílago, *verdes;* los eritrocitos, *rojos* o *amarillos;* los granos de secreción, *rojos* o *verdes*.

Tinción con el cristal violeta (según Nassonov). Teñir con la rosanilina ácida sulfonada de Altmann; lavar; teñir 10 minutos en una solución saturada de cristal violeta en etanol de 70°; lavar; diferenciar con una solución saturada de aurantia

en etanol de 70°; lavar con etanol de 96°; deshidratar; montar.

Los dictiosomas quedan *negros* si el material ha sido fijado con un líquido osmificado; el condrioma, *violeta* oscuro; los granos de secreción, *rojos*, así como el nucléolo, la cromatina, *violeta* pálido; el citoplasma, *amarillo*, y los eritrocitos, *rojos* o *amarillos*.

II. — TINCIÓN DE LOS ORGÁNULOS CITOPLASMÁTICOS

A continuación indicamos los métodos para diferenciar los orgánulos citoplasmáticos al microscopio fotónico, según Nassonov (1923):

— fijación con el líquido de Champy, inclusión sin impregnación ósmica, observación de cortes desparafinados y montados sin previa tinción: granos de secreción teñidos de amarillo claro, el condrioma y los cuerpos de Golgi quedan invisibles;

— fijación con el líquido de Champy, inclusión sin impregnación ósmica, tinción con la fucsina de Altmann (cristal violeta-aurantia): condriosomas de color violeta, granos de secreción en rojo, cuerpos de Golgi invisibles o que aparecen en negativo;

— fijación con el líquido de Champy, impregnación ósmica, observación de los cortes desparafinados y montados sin previa tinción: cuerpos de Golgi en negro, granos de secreción teñidos de amarillo;

— fijación con el líquido de Champy, impregnación ósmica, tinción de los cortes con la fucsina de Altmann (cristal violeta-aurantia): cuerpos de Golgi en negro, condriosomas en violeta, granos de secreción en rojo;

— fijación con el líquido de Zenker o con el de Carnoy, inclusión en parafina, tinción con la hematoxilina férrica de Heidenhain: condriosomas y cuerpos de Golgi invisibles, granos de secreción conservados o no, núcleos, corpúsculos basales de los cilios, ergastoplasma y estructuras diversas se visualizan muy bien.

Tinción del ergastoplasma

Impregnación argéntica según Fernández-Galiano. — Cortar por congelación; tratar 10 minutos con una solución acuosa al 0,5 % de tanino: lavar; introducir los cortes en un baño formado por: agua destilada: 10 ml + complejo amoniacal de plata (cf. p. 249): 5 gotas; dejarlos en este baño hasta que adquieran una tonalidad amarillenta; pasarlos al agua destilada; la tinción queda incrementada, reducir con formol al 20 % durante 2 minutos; lavar cuidadosamente deshidratar y montar.

El ácido ribonucleico que lo forma se pone de manifiesto por su absorción a la luz U.V., siendo totalmente invisible con el contraste de fases y con el contraste interferencial.

El material fijado permitirá que el ergastoplasma sea teñido con cualquiera de las técnicas que pongan de manifiesto su basofilia: hemalumbre-picrocarmín de índigo o el tricrómico a base de safranina, todos los eosinatos de azul, el cristal violeta, el violeta de cresil, el azul de toluidina, etcétera.

Tinción del centrosoma

Tricrómico de Flemming-Matthey. — Teñir con la solución hidroalcohólica de safranina al 1 %, durante 3 horas; lavar 3 veces en agua; tratar con alcohol yodado durante 5 minutos (IK: 2 g + etanol de 80°: 300 ml + yodo: 1 g); teñir durante 1 minuto con una solución acuosa al 1 % de cristal violeta; lavar; tratar nuevamente durante 20 segundos con el alcohol yodado; lavar dos veces consecutivas con etanol absoluto durante 10 segundos cada vez. Diferenciar bajo el microscopio con la esencia de girasol saturada de naranja G; pasar por varios baños de benceno; montar. En el citoplasma amarillo-pardusco, destacan el centrosoma, el aparato fusorial; las estructuras fibrilares aparecen nítidamente, la cromatina interfásica queda de color *azul*; los cromosomas, *rojos*, así como los nucléolos y los eritrocitos; los lípidos osmiófilos quedan negros con el fijador ósmico.

Tinción de los granos de secreción

Dada su refringencia son fácilmente observables en vivo y sobre todo en contraste de fases o en contraste interferencial.

Se tiñen con los *colorantes neutros*, tales como el violeta de etilo-naranja G.

Teñir durante 24 horas en una solución hidroalcohólica obtenida diluyendo por 9 volúmenes de agua destilada, 1 volumen de la solución madre del colorante disuelto a saturación en etanol de 96°; escurrir; deshidratar; pasar por dos

baños de acetona de 10 segundos; diferenciar con esencia de girasol; pasar por benceno y montar.

Tinción después de oxidación. — Tras la oxidación con el permanganato en medio sulfúrico o por los ácidos perfórmico o peracético, se lleva a cabo una tinción con colorantes básicos: laca crómica de hematoxilina, azul de toluidina, tionina-paraldehído, phtalocianinas, etc. Para más detalles remítase a Gabe (1968) páginas 764 y siguientes.

III. — CITODIAGNÓSTICO CARCINOLÓGICO

Al igual que G. Castelain reconocemos la gran importancia del citodiagnóstico en carcinología. Todo estudio citológico comporta una parte técnica que consta de extensiones perfectamente visibles e interpretables; de ahí la importancia de la extracción de la muestra, de la fijación y de los colorantes utilizados.

Extracción de la muestra. — Puede hacerse de distintas maneras:

a) Punción con una aguja fina de toda tumefacción o derrame accesible sin peligro, la aspiración se realiza mediante una jeringa de 20 ml a 50 ml.
b) Aspiración dirigida: limpieza o raspado.
c) Raspado de una lesión cutánea o mucosa con la ayuda de una espátula o de un vacci-nostilo.
d) Frotis por aposición sobre un portaobjetos, o extensión de una extracción del jugo celular de la superficie de la sección de un tumor biopsado o extraído quirúrgicamente.
e) Recogida de células sobre un filtro millipore, procedentes de la orina o de derrames.

Los líquidos deben ser centrifugados lo más rápidamente posible, a fin de evitar las alteraciones celulares. Si la centrifugación inmediata no fuera posible es aconsejable añadir 1 ml de formol al 14 % por cada 9 ml de líquido, o una cantidad igual al material extraído de alcohol de 95°. Esta prefijación con alcohol no puede ser utilizada si se hace la concentración celular con los filtros millipores ya que alteraría el filtro y perjudicaría la tinción posterior.

En el caso de las orinas se añade una parte equivalente de formol enseguida después de haber sido emitidas. Para los líquidos con escasa concentración celular (líquido cefalorraquídeo), es necesario utilizar citocentrífugas especiales que concentran directamente las células sobre los portaobjetos, haciendo que su examen sea más rápido y más fructuoso.

Fijación. — Difiere según las tinciones que se piensen aplicar. Para los portaobjetos destinados a las tinciones del Papanicolaou o del Harris Shorr, es indispensable sumergir inmediatamente las extensiones húmedas en la mezcla: etanol 95° + éter: aa.

Este tiempo debe durar de 20 a 30 minutos pero puede prolongarse sin inconveniente durante varios días.

Esta mezcla fijadora es particularmente inflamable, algunos laboratorios utilizan el metanol de 95° al que se le han añadido 5 g de ácido tricloroacético por 1 litro. Si se utiliza la técnica de los filtros millipores hay que fijar la membrana con el etanol de 95° dejándolo únicamente 5 minutos salvo si el material ha sido prefijado.

La fijación por el citofijador RAL aerosol 31 405 vaporizado inmediatamente después de haber efectuado la extensión, tiende a generalizarse, dado que es muy práctica. En este caso, antes de la tinción debe eliminarse la laca sumergiendo los portaobjetos en alcohol de 50° durante 20 a 30 minutos.

También puede utilizarse para el citodiagnóstico extemporáneo la fijación inmediata por el líquido de Carnoy. Este fijador posee propiedades hemolíticas, lo cual puede ser interesante en el estudio de determinadas secreciones muy hemorrágicas.

Otro de los fijadores rápidos que dan igualmente buenos resultados es el de Delaunay, cuya composición es la siguiente:

Metanol absoluto: 50 ml + acetona: 50 ml + ácido tricloroacético: 0,2 g.

Fijación durante 5 a 10 segundos, pero los portaobjetos pueden permanecer en él durante mucho tiempo sin ninguna repercusión.

TINCIONES

Tres coloraciones son utilizadas corrientemente en citología: la del Papanicolaou, de Harris Shorr y la de May-Grünwald Giemsa.

Las describiremos sucesivamente, comentándolas brevemente en cuanto a sus resultados y sus

ventajas e inconvenientes, así como las precauciones a tomar en cada caso.

Tinción del Papanicolaou. — Se trata de una técnica diferencial. El colorante nuclear, la hematoxilina de Harris, da una impregnación excelente y suficientemente fina de la estructura cromatínica. El naranja G y la EA 50: solución alcohólica hecha de verde luz, pardo de Bismarck y de eosina dan al citoplasma una gran transparencia.

Evitando dejarlos secar al aire, los frotis se pasan sucesivamente en los siguientes baños:

1-Etanol de 80°	30 s
2-Etanol de 70°	30 s
3-Etanol de 50°	30 s
4-Agua destilada	30 s
5-Hematoxilina de Harris	1 a 3 min
6-Agua destilada	30 s
7-Solución de ácido clorhídrico al 0,25 %	sumergir 6 veces
8-Agua corriente	6 min
9-Agua destilada	30 s
10-Etanol de 50°	30 s
11-Etanol de 70°	30 s
12-Etanol de 80°	30 s
13-Etanol de 95°	30 s
14-Naranja G. 6	90 s
15-Etanol de 95°	30 s cubetas
16-Etanol de 95°	30 s individuales
17-EA 50 o EA 36	90 s
18-Etanol de 95°	30 s cubetas
19-Etanol de 95°	30 s individuales
20-Etanol de 95°	30 s
21-Etanol absoluto	30 s
22-Etanol xilol + etanol	30 s
23-Xilol	30 s

Montaje con Eukitt o con bálsamo del Canadá, teniendo la precaución de poner el producto sobre el cubreobjetos.

La filtración cotidiana de algunos colorantes es necesaria.

Indicaciones. — Estudio de frotis de diagnóstico ginecológico. Búsqueda de células neoplásicas en los esputos y en las secreciones broncoaspiradas. Estudio citológico de los tumores y de derrames.

Resultados. — Los núcleos quedan teñidos de color *gris azulado*. El citoplasma de las células eosinófilas, en *rosa* o en *naranja*. Las células cianófilas toman una tonalidad *azul* clara, a veces verdosa, más intensa para las células jóvenes.

Ventajas. — Ausencia de tinción del mucus, lo que hace que la lectura del frotis del esputo o del cuello uterino sea más fácil. Identificación fácil y rápida de las células queratinizadas en los epiteliomas epidérmicos maduros.

Inconvenientes. — Necesidad de numerosas cubetas.

Riesgo de contaminación al pasar por los diferentes baños. En ocasiones, dificultad en diferenciar la cromatina de los nucléolos.

Tinción de Harris Shorr. — Asocia una tinción nuclear con la hematoxilina de Harris con una tinción citoplasmática con el reactivo de Shorr.

Los pasos se hacen en los siguientes baños, evitando que los portaobjetos se sequen.

1-Alcohol de 70°	sumergir 10 veces sucesivas
2-Alcohol de 50°	sumergir 10 veces sucesivas
3-Agua destilada	sumergir 10 veces sucesivas
4-Hematoxilina de Harris	1 a 3 minutos
5-Agua destilada	lavado rápido
6-Agua destilada	lavado rápido
7-Alcohol amoniacal 97 ml de alcohol + 70° 3 ml de amoníaco	1 minuto hasta que el frotis adquiera una tonalidad azulada
8-Agua destilada	lavado rápido
9-Alcohol de 70°	lavado rápido
10-Alcohol de 95°	lavado rápido
11-Reactivo del Shorr	30 s a 3 minutos
12-Alcohol de 95°	lavado rápido
13-Alcohol absoluto	lavado rápido
14-Toluol	30 s

Montaje en bálsamo del Canadá o en Eukitt.

Las tinciones nucleares y citoplasmáticas son comparables a las de la tinción anterior; sin embargo, hay una mejor diferenciación de los nucléolos que contrastan por su coloración *roja* con la cromatina *gris azulada.*

La diferenciación citoplasmática es excelente. Hay igualmente un riesgo de contaminación cuando se pasan los portaobjetos por los distintos baños sucesivos pero el tiempo y el material es reducido.

Indicaciones. — Las mismas que en el caso del Papanicolaou.

Tinción policrómica del May-Grünwald y Giemsa. — Permite teñir simultáneamente los elementos basófilos, las estructuras eosinófilas o azurófilas, así como las granulaciones neutrófilas. Fijación por desecación.

Para la automatización de esta técnica véase la página 222).

1. Verter sobre la extensión de 10 a 15 gotas de May-Grünwald, de manera que quede totalmente recubierta. Dejar actuar durante 3 minutos.
2. Sin lavar, añadir 15 gotas de agua destilada, dejar actuar 1 minuto después de haber mezclado por suave agitación.
3. Preparar extemporáneamente una solución de

Giemsa rápida 30 gotas por 20 ml de agua destilada neutra o 3 gotas por 2 ml de agua destilada.
4. Escurrir los portaobjetos (frotis rosa anaranjados) y sin lavar verter la solución de Giemsa diluido hasta cubrir totalmente el portaobjetos.
5. Dejar actuar de 15 a 20 minutos aproximadamente.
6. Lavar rápidamente con agua destilada.
7. Escurrir inclinando los portaobjetos, dejar secar al aire o con un papel de filtro, aplicado suavemente sobre la extensión.

Precauciones. — Debe utilizarse agua neutra preparada bajo la forma de tampón fosfato a pH 7. Si el agua es ácida, los hematíes quedan *rojos*, los núcleos quedan apenas teñidos. Si el agua es alcalina, los hematíes quedan de color *azul claro*; los núcleos, *violeta oscuro*.

La cianofilia de determinadas células anormales puede ser particularmente intensa, especialmente en los derrames; en este caso se recomienda hacer varias extensiones y observar el portaobjetos después de 5 o 10 minutos de tinción con el Giemsa.

Indicaciones:

Estudio citológico de extensiones después de punción.

Estudio citológico de los tumores.

Estudio citológico de derrames.

Resultados. — Los hematíes quedan de color rosa.

Los núcleos quedan *violeta* más o menos oscuro, el citoplasma de las células basófilas es *azul nítido*, el de las células queratinizadas, *azul oscuro*.

Las granulaciones basófilas quedan *azul negro*.

Las granulaciones eosinófilas quedan *rojo ladrillo*.

Ventajas. — Excelente definición de las estructuras nucleares. Nucléolos bien individualizados. Posibilidad de volver a teñir con el Giemsa en el caso de que la tinción hubiera quedado débil. Posibilidad de desteñir con alcohol absoluto o de 95° en caso de que hubiera una sobretinción. Visualización del mucus teñido en *rosa*, áreas secretoras y granos de secreción de algunos adenocarcinomas y mesoteliomas.

Inconvenientes. — La tinción del mucus puede molestar la lectura de las extensiones de diagnóstico ginecológico y bronquial. La identificación de células queratinizadas es menos fácil que con las tinciones del Papanicolaou y de Harris Shorr.

Tinción con el naranja de acridina en fluorescencia. — El naranja de acridina da una fluorescencia *anaranjada* o *roja* a las células con elevado contenido en ácido ribonucleico como los elementos neoplásicos. A continuación, detallamos la técnica recomendada por Von Bertalanffy:

Lavar con agua destilada, seguido de otro lavado con el ácido acético al 1 %. Lavar nuevamente con agua destilada. Teñir con una solución de naranja de acridina al 0,01 % en agua destilada con tampón fosfato 1/15 (pH 6): 3 minutos. Diferenciar con la solución tampón fosfato: 1 minuto. Pasar por cloruro cálcico 1/10: 30 segundos. Lavar con la solución tampón. Secar con papel de filtro y montar en una gota de solución tampón. Observar con el microscopio de fluorescencia.

Tinción de Guard para la cromatina sexual. — Con la ayuda de una lámina de vidrio o de una espátula, recoger las células de la mucosa bucal o vaginal y extenderlas sobre un portaobjetos limpio. Si el material recogido es poco abundante, extender únicamente sobre una parte limitada del portaobjetos. Fijar inmediatamente. Extraer al mínimo para hacer cuatro extensiones pasando varias veces sobre la misma región de la mucosa bucal o vaginal. Las extensiones para determinación del genotipo sexual pueden teñirse con el método del Papanicolaou, con la hematoxilina-eosina o con el colorante de Guard, especialmente ideado para poner en evidencia la cromatina sexual.

Método:

— Después de haber fijado con éter-alcohol, transportar los portaobjetos al alcohol de 70°	2 min
— Teñir con una solución de escarlata Biebrich	2 min
— Tinción por diferenciación con una solución de verde intenso FCF unas	4 horas
— Controlar al microscopio cada hora. La diferenciación es completa cuando todas las células y los núcleos quedan *verdes*, a excepción de los núcleos picnóticos que conserva una tonalidad *rojo intensa*. La cromatina sexual queda teñida de rosa a rojo.	
— Lavar con alcohol de 50°	5 min
— Pasar sucesivamente por alcohol de 70°, 95° y en el alcohol absoluto.	
— Lavar tres veces con xilol, dejándolo 2 min cada vez.	
— Montar.	

IV. — CONCLUSIÓN

La mayoría de los trabajos efectuados al microscopio darán lugar a una comunicación o a una publicación. No parece pues inútil formular, al concluir, algunas recomendaciones para la redacción de dichos textos.

1.º Vaya directo al hecho esencial que será su conclusión; empiece la redacción por el final.

2.º Demuestre su hipótesis exponiendo los detalles más significativos en los que se basa.

3.º Formule ingeniosamente sus teorías y vuelva a considerarlas en las conclusiones.

4.º Sitúe su trabajo con relación a otros anteriores y actuales.

5.º Sitúese en el lugar del lector, escriba para él y no para usted. Haga releer su texto a otra persona.

6.º Defina su objetivo y profundice en él.

7.º Escoja sus argumentos y ordénelos.

8.º Utilice un vocabulario sencillo, accesible; defina todos los conceptos nuevos que puedan aparecer en el texto.

9.º Haga frases claras y concisas.

10.º Entre dos sinónimos escoja el más corto.

11.º Elimine los sustantivos abusivos, los calificativos rimbombantes, las redundancias inútiles.

12.º Emita una sola idea en cada frase.

13.º Sea directo, evite la divagación.

14.º Ilustre para hacer pensar y no para recrear la vista.

15.º Cite para demostrar que ha reflexionado y no únicamente para indicar que ha leído.

16.º Recuerde: Napoleón Bonaparte indicó como longitud ideal de una frase la de 14 palabras (es la longitud de esta frase, sin contar el paréntesis).

17.º Calcule el índice de legibilidad I_G de su texto con la fórmula de Gurning:

I = (Nb media de palabras por frase + % de palabras de más de 3 sílabas) × 0,4

El índice de legibilidad de esta conclusión es de 8.

18.º Vuelva a escribir su texto si su índice de legibilidad sobrepasa 14. Recuerde que el índice óptimo es de 8.

19.º No olvide utilizar la tipografía para facilitar el entendimiento de su texto.

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

7/
ANEXOS

VOCABULARIO TÉCNICO
CONSTANTES FISICOQUÍMICAS
BIBLIOGRAFÍA
ÍNDICE ALFABÉTICO

C ALEX

I. — VOCABULARIO TÉCNICO

ESPAÑOL	FRANCÉS	ALEMÁN	INGLÉS
Aberración.	Aberration.	Aberration.	Aberration.
Abertura.	Ouverture.	Offnung.	Aperture.
Abertura numérica.	Ouverture numérique.	Numerische Apertur.	Numerical aperture.
Absorción.	Absorption.	Absorption.	Absorption.
Accesorio de la iluminación.	Accessoires d'éclairage.	Beleuchtungszubehöre.	Illumination accessoiries.
Accesorios.	Accesoires.	Zubehöre.	Accessories, outfit.
Aceite de inmersión.	Huile è immersion.	Immersionsöl.	Immersion oil.
Acomodación al infinito.	Accommodation sur l'infini.	Entspanntes Auge.	Relaxed eye.
Acomodado.	Accommoder.	Akkomodieren.	To accommodate.
Acromado.	Achromat.	Achromat.	Achromatic objective.
Acromático.	Achromatique.	Achromatisch.	Achromatic.
Acromatismo.	Achromatisme.	Achromatismus.	Achromatism.
Acromatizar.	Achromatiser.	Achromatisieren.	To achromatize.
Afilado.	Affûtage.	Schleifen, Schärfen.	Sharpening.
Agudeza visual.	Acuité visuelle.	Sehschärfe.	Sharpness of vision.
Aguja.	Aiguille.	Nadel.	Needle.
Aguja de disección.	Aiguille à dissection.	Präpariernadel.	Dissecting needle.
Aislado.	Isolé.	Isoliert.	Isolated, Insulated.
Ajustable o regulable.	Ajustable.	Verstellbar.	Ajustable.
Ajustado o regulado.	Ajuster.	Einstellen.	To adjust.
Ajuste.	Serrage.	Blockierung.	Locking.
Albúmina glicerinada: Albúmina de Mayer.	Albumine glycérinée: Albumine de Mayer.	Eiweissglyzerin.	Albumin-glycerin.
Alimentación.	Alimentation.	Belastung.	Input.
Amplitud.	Amplitude.	Amplitude.	Amplitude.
Analizador.	Analyseur.	Analysor.	Analyser.
Ángulo de incidencia.	Angle d'incidence.	Einfallswinkel.	Angle of incidence.
Ángulo de mira.	Angle de vue.	Sehwinkel, Blickwinkel.	Angle of view.
Ángulo de refracción.	Angle de réfraction.	Brechungswinkel.	Angle of refraction.
Anilla de fase: Placa de fase.	Anneau de phase: Plaque de phase.	Phasenring.	Phase ring.
Anillo intermediario.	Bague intermédiaire.	Zwischenstück.	Intermediate piece.
Anillo de medición.	Bague de réglage.	Einstellring.	Ajusting ring.
Anillo de serrado.	Bague de serrage.	Klemmring.	Clamp collar.
Anisometropía.	Anisométropie.	Ungleichsichtigkeit.	Anisometropia.
Anisotropía.	Anisotropie.	Anisotropie.	Anisotropia.
Anteojos.	Œillère.	Augenmuschel, Okularmuschel.	Eye cup, Eye guard, Eyepiece cup.
Anular.	Annulaire.	Ringförmig.	Ring-shaped, Annular.
Aparato de dibujar.	Appareil à dessiner.	Zeichenapparat.	Drawing apparatus.
Aparato de difracción.	Appareil de diffraction.	Diffraktionsapparat.	Diffraction apparatus.
Aparato de iluminación.	Appareil d'éclairage.	Beleuchtungsapparat.	Illuminating apparatus: Illumination oufit.
Apertómetro.	Apertomètre.	Apertometer.	Apertometer.
Aplanático.	Aplanétique.	Aplanatisch.	Aplanatic.
Apocromático.	Apochromatique.	Apochromatisch.	Apochromatic.
Armar.	Armer.	Verschluss spanner.	To set.
Artefacto.	Artéfact.	Artefakt.	Artefact.
Astigmatismo.	Astigmatisme.	Astigmatismus.	Astigmatism.
Aumentar.	Agrandir.	Vergrössern.	Magnify.
Aumento inicial.	Grossissement propre.	Eigenvergrösserung.	Initial magnification.
Aumento lineal.	Grossissement linéaire.	Lineare Vergrösserung.	Linear magnification.
Aumento superfluo.	Grossissement superflu.	Leere Vergrösserung.	Empty magnification.
Aumento total o final.	Grossissement final ou total.	Endvergrösserung.	Final magnification.

Aumento útil.	Grossissement utile.	Förderliche Vergrösserung.	Useful magnification.
Aumentos bajos.	Grossissement faible.	Lupenvergrösserung, Schwache Vergrösserung.	Low power magnification.
Azul de metileno.	Bleu de méthylène.	Methylenblau.	Methylene blue.
Bacteria.	Bactérie.	Bakterie.	Bacterium.
Bálsamo del Canadá.	Baume du Canada.	Kanadabalsam.	Canada balsam.
Banco óptico.	Banc optique.	Prüfbank.	Optic bench.
Barniz agrietado.	Vernis craquelé.	Runzel.	Crackle finish, Wrinkle finish.
Base de caucho antivibratorio.	Tapis de caoutchouc antivibratoire.	Schaumgummiunterlage.	Sponge rubber support.
Benceno.	Benzène.	Benzol.	Benzol.
Betún.	Lut.	Kitt.	Cement.
Binocular.	Binoculaire.	Binokular.	Binocular.
Birrefringencia.	Biréfringence.	Doppelbrechung.	Double refraction.
Birrefringente.	Biréfringent.	Doppelbrechend.	Double refracting.
Bisel, sesgado.	Biseau, Biais.	Anschrägung.	Facet.
Blanqueamiento.	Blanchiment.	Bleiche.	Bleaching.
Blocaje.	Blocage.	Blockierung.	Blocking.
Bloqueado.	Blocable.	Feststellbar.	Lockable.
Bloquear.	Bloquer.	Einrasten.	To lock.
Bola.	Bulle.	Blase.	Blister, Bubble.
Bola de aire.	Bulle d'air.	Luftblase.	Air-bubble.
Botón.	Bouton.	Knopf, Griff.	Knob.
Botón mullido.	Bouton molleté.	Rändel.	Milled knob. Knurled head.
Botón de mando.	Boutons de commande.	Bedienungsknöpfe.	Control-knobs.
Brillantez.	Brillance.	Helligkeit, Lichtstärke.	Brightness.
Bujía.	Bougie.	Kerze.	Candle.
Calefactora.	Chauffage.	Heizung.	Heating.
Calibración.	Étalonnage.	Eichung.	Calibration.
Calibrar.	Étalonner.	Eichen.	To calibrate.
Calibre para cubreobjetos.	Calibre pour couvre-objet.	Deckglastaster.	Cover glass gauge.
Calidad de la imagen.	Qualité de l'image.	Bildgüte.	Picture quality.
Calidad de la superficie.	Qualité de la surface.	Oberflächengüte.	Surface finish, Surface quality.
Cuarzo.	Quartz.	Quarz.	Quartz.
Cámara clara.	Chambre claire.	Zeichenapparat.	Drawing apparatus.
Cámara fotomicrográfica ocular.	Chambre photomicro-graphique oculaire.	Aufsatzkamera.	Attachable camera.
Cámara de emisión.	Tirage de la chambre.	Kameraauszug.	Camera extension.
Cámara para enumerar.	Chambre à numération.	Zählkammer.	Counting chamber.
Cambiador de filtros.	Changeur de filtre.	Filterwechsler.	Filter exchanger.
Campo claro.	Fond clair.	Hellfeld.	Bright field.
Campo oscuro.	Fond noir.	Dunkelfeld.	Dark ground, dark field.
Campo de investigación.	Champ d'investigation; Domaine de recherche.	Forschungsgebiet.	Research field.
Campo de observación.	Champ visuel.	Gesichtsfeld.	Field of view.
Capilaridad.	Capillarité.	Kapillarität.	Capillarity.
Cápsula.	Capsule.	Kapsel.	Capsule, cap.
Características.	Caractéristique.	Kennzeichen.	Characteristic.
Cardioide.	Cardioïde.	Kardioid.	Cardioid.
Casquete.	Douille.	Schiebehülse.	Sliding sleeve.
Casquete del condensador.	Douille coulissante du concentrateur.	Kondensorchiebehülse.	Condenser sliding sleeve.
Célula.	Cellule.	Zelle.	Cell.
Cementado.	Dommage.	Beschädigung.	Damage.
Cementar.	Luter, Vernier.	Kitten, Nonius.	To cement, Vernier.
Centrado.	Centrer.	Zentrieren.	To centre.
Centraje.	Centrage.	Zentrierung.	Centering.
Cierre a bayoneta.	Fermeture à baïonnette.	Bayonèttverschluss.	Bayonet fastener, or fitting.

Cinemicrografía.	Cinémicrographie.	Mikrokinematographie.	Cinemicrography.
Círculo de difusión.	Cercle de diffusion.	Zeirtreuungskreis.	Diffusion circle.
Clara.	Clair.	Hell.	Bright.
Coaxial.	Coaxial.	Koaxial.	Coaxial.
Cola de milano (ensamblaje).	Queue d'aronde.	Schwalbe.	Dovetail.
Colección de muestras.	Collection d'échantillons.	Mustersammlung.	Range of samples.
Colector.	Collecteur.	Kollektor.	Collector.
Colector centrable.	Collecteur centrable.	Zentriereinsatz.	Centering lens.
Color espectral.	Couleur spectrale.	Spektralfarbe.	Spectrum line.
Color de interferencia.	Couleur d'interférence.	Interferenzfarben.	Interference colors.
Coloración.	Coloration.	Färbung.	Staining.
Colorante.	Colorant.	Farbstoff.	Stain.
Colores complementarios.	Couleurs complémentaires.	Komplementärfarben.	Complementary colors.
Coma.	Coma.	Koma.	Coma.
Comparativo.	Comparatif.	Vergleichende.	Comparative.
Compensador.	Compensateur.	Kompensator.	Compensator.
Compensar.	Compenser.	Kompensieren.	To compensate.
Concentración.	Concentration.	Konzentration.	Concentration.
Concentrador, Condensador.	Concentrateur. Condensateur.	Kondensor.	Condenser.
Concordancia.	Concordance.	Uebereinstimmung.	Conformity, Consistency.
Concordancia de fases.	Concordance de phase.	Phasenübereinstimmung.	Phase coincidence.
Condensador cardioide.	Concentrateur cardioïde.	Kardioidkondensor.	Cardioid condenser.
Condensador a inmersión.	Concentrateur à immersion.	Immersionskondensor.	Immersion condenser.
Condensador con lente frontal abatible.	Concentrateur à lentille frontale escamotable.	Klappkondensor.	Condenser with swing-out front lens.
Condensador de Abbe.	Concentrateur d'Abbe.	Abbe'scher Kondensor.	Abbe's condenser.
Condensador de gran campo.	Concentrateur à grand champ.	Uebersichtskondensor.	Wide field condenser.
Condensador de larga distancia focal.	Concentrateur à longue focale.	Kondensor langer Schnittweite.	Long-focus condenser.
Condensador para iluminación incidente.	Concentrateur pour éclairage incident.	Auflicht-Kondensor.	Vertical uminator.
Conexión eléctrica.	Connexion électrique.	Netzanschluss.	Power supply.
Congelación.	Congélation.	Gefrieren.	Congelation.
Conservación.	Consservation.	Konservierung.	Preservation.
Constante de la red.	Constante du réseau.	Gitterkonstante.	Grating constant.
Construcción.	Conttruction.	Konstruktion.	Design.
Contador de imágenes o de impulsos.	Compteur d'images ou d'impulsions.	Einzelbildzählwerk.	Frame counter.
Contraste.	Contraste.	Kontrast.	Contrast.
Contraste de fases.	Contraste de phase.	Phasenkontrast.	Phase contrast.
Controlador.	Contrôler.	Prüfen.	To test.
Converger.	Converger.	Sammeln.	To collect, to concentrate.
Corpúsculos.	Corpuscules.	Körperchen.	Particle.
Corrección de la curvatura de campo.	Correction de la courbure de champ.	Bildfeldebnung.	Flattening of the image field.
Corredera.	Curseur.	Schieber.	Cursor.
Corte.	Coupe.	Schnitt, Schliff.	Section.
Corte montado.	Coupe montée.	Schnittpräparat.	Section slide.
Cremallera.	Crémaillèe.	Zahnstange.	Rack.
Cristal.	Cristal.	Kristall.	Crystal.
Cristalización.	Cristallisation.	Kristallisation.	Crystallisation.
Cromado.	Chromage.	Verchromung.	Chrome plating.
Cromar.	Chromer.	Verchromen.	To chrome-plate.
Cromático.	Chromatique.	Chromatisch.	Chromatic.
Cruz de referencia.	Croix de repère.	Strichkreuz.	Cross lines.
Cuadriculado.	Quadrillé.	Netzartig.	Netlike, Reticular.
Cubreobjetos.	Couvre-objet.	Deckglas.	Cover-glass, cover slip.
Cuenta glóbulos.	Compte-globules.	Blutzählkammer.	Blood counting chamber.
Curvatura de campo.	Courbure de champ.	Bildfeldwölbung.	Curvature of field.
Chasis.	Châssis.	Kassette.	Film-holder, Plateholder.

Desembrague a fricción.	Débrayage à friction.	Ausklinkvorrichtung.	Catch release.
Debilitador.	Affaiblisseur.	Abschwacher.	Reducer, Reducing agent.
Decoloración.	Décoloration.	Entfärbung.	Decolorization, Bleaching.
Decolorante.	Décolorant.	Bleichmittel.	Bleaching agent.
Defectos de la imagen.	Défauts de l'image.	Abbildungsfehler.	Defects of image.
Degradación.	Dégradation, Vignettage.	Vignettierung.	Vignetting.
Demostración.	Démonstration.	Vorführung.	Demonstration.
Densidad.	Densité.	Dichte.	Density.
Denso (medio).	Dense (milieu).	Dicht (Medium).	Dense (medium).
Desconectador.	Déconnecter.	Ausschalten.	To switch-of: To cut-out.
Deshidratación.	Déshydratation.	Wasserentziehung.	Dehydration.
Designación.	Désignation.	Bezeichnung.	Type of component.
Deslizamiento por bolas.	Roulement à billes.	Kugellager.	Ball bearing.
Desmontar.	Démonter.	Auseinandernehmen.	To take to pieces, To dismantle.
Desparafinado.	Déparaffiner.	Entparaffinieren.	To remove the parafin.
Despegado.	Détachable.	Aufsetzbar.	Attachable.
Desplazamiento.	Déplacement.	Bewegung.	Motion.
Desviación.	Déviation.	Abweichung.	Deviation, Aberration.
Determinación.	Détermination.	Bestimmung.	Determination.
Diafragma.	Diaphragme.	Blende.	Light stop, Diafragm, Aperture stop.
Diafragma fijo.	Diaphragme fixe.	Lochblende.	Stop diaphragm.
Diafragma iris.	Diaphragme iris.	Irisblende.	Iris diaphragam.
Diafragma ocular.	Diaphragme ocular.	Okularblende.	Eyepiece diaphragm or stop.
Diafragma de abertura.	Diaphragme d'ouverture.	Aperturblende.	Aperture stop or diaphragm.
Diafragma de campo.	Diaphragme de champ.	Leuchtfeldblende, Gesichtsfeldblende.	Field stop, Field diaphragm.
Diafragma de campo oscuro.	Diaphragme à fond noir.	Dunkelfeldblende.	Dark ground stop.
Diafragmar.	Diaphragmer.	Ausblenden.	To stop down.
Diámetros.	Diamètre.	Durchmesser.	Diameter.
Diatomea.	Diatomée.	Kieselalgen.	Diatom.
Dibujar.	Dessiner.	Zeichnen.	To draw.
Dibujo.	Dessin.	Zeichnung.	Pattern.
Diferencia cromática.	Différence chromatique.	Chromatische Differenz.	Chromatic difference.
Diferencia de fases.	Différence de phase.	Phasenverschiebung.	Phase shift, Phase difference.
Difracción.	Diffraction.	Ausblendung, Beugung.	Scattering (of rays), Diffraction.
Dirección de los rayos.	Marche des rayons.	Strahlengang.	Path of rays.
Disección.	Dissection.	Sezieren.	Dissection.
Disociación.	Dissociation.	Zerfall.	Dissociation.
Disolvente.	Diluant.	Verdünnungsmittel.	Diluent.
Disparador flexible.	Déclencheur, flexible.	Drahtauslöser.	Cable release.
Disparar.	Déclancher.	Auslösen.	To release.
Dispositivo de centrado.	Dispositif de centrage.	Zentriervorrichtung.	Centering device.
Dispositivo de polarización.	Dispositif de polarisation.	Polarisationseinrichtung.	Polarization attachment.
Distancia focal.	Distance focal.	Brennweite.	Focal length.
Distancia frontal, Distancia de trabajo.	Distance frontale, Distance de travail.	Arbeitsabstand.	Working distance.
Distancia interpupilar.	Distance interpupillaire.	Augenabstand.	Interocular distance.
Distinción.	Distinction.	Auszeichnung.	Distinction.
Distorsión.	Distorsion.	Bildfehler, Verdrehung, Verzeichung.	Distinction. Image defect, Image distorsion. Distorsion.
Divergente.	Divergent.	Divergent.	Diverging, Divergent.
Doble refracción.	Double réfraction.	Doppelbrechung.	Double refraction.
Dominio.	Domaine.	Bereich.	Range.
Dominio de desplazamiento.	Domaine de déplacement.	Bewegungsbereich.	Range of motion.
Eje óptico.	Axe optique.	Optische Achse.	Optical axis.

Eje de mando.	Axe de commande.	Antriebsachse.	Driving axis.
Emisión.	Tirage.	Auszug.	Extension. Draw-(tube).
Encuentro de rayos.	Rencontre des rayons.	Strahlenvereinigung.	Fusion of rays.
Enfoque.	Mise au point.	Scharfeinstellung.	Sharp focusing or setting.
Enfoque al infinito.	Mise au point à l'infini.	Unendlicheinstellung.	Infinity adjustement.
Enfoque de ajuste.	Domaine de réglage.	Einstellbereich.	Range of adjustment or setting.
Enfoque fino o micrométrico.	Mise au point fine ou micrométrique.	Feinstellen.	Fine adjustment.
Enfoque micromagnético.	Mise au point micromagnétique.	Elektromagnetische Feinbewegung.	Electromagnetic fine adjustement.
Enfoque rápido.	Mise au point rapide.	Gross-stellen.	Coarse focusing.
Englobación.	Enrobage.	Einbettung.	Embedding.
Englobar.	Enrober.	Einbetten.	To embed.
Epiiluminación. Episcopia. Iluminación incidente.	Épiéclairage. Episcopie. Éclairage incident.	Auflichtbeleuchtung.	Vertical illumination. Incident light.
Equilibrio óptico.	Équilibre optique.	Optischer Ausgleich.	Optical balance.
Equipamiento.	Équipement.	Ausrüstung.	Equipment. Outfit.
Equipo óptico (dotación óptica).	Équipement optique.	Optische Ausrüstung.	Optical equipment.
Equipo de polarización.	Équipement de polarisation.	Polarisationsapparat.	Polarizing apparatus.
Error acimutable.	Erreur azimutale.	Azimutfehler.	Azimutal error.
Escala graduada.	Échelle graduée.	Gradeinteilung.	Graduation. Division.
Escala de la imagen.	Échelle de l'image.	Abbildungsmaßstab.	Image scale. Picture scale.
Escalpelo.	Scalpel.	Skalpell.	Scalpel.
Escamotable.	Escamotable.	Ausklappbar.	Swinging-out.
Esférico.	Sphérique. Asphérique.	Sphärisch. Asphärisch.	Spherical. Aspherical.
Específico.	Spécifique.	Spezifisch.	Specific.
Espectro de absorción.	Spectre d'absorption.	Absorptionsspektrum.	Absorption spectrum.
Espectro de bandas.	Spectre de bande.	Bandspektrum.	Band spectrum.
Espejo plano.	Miroir plan.	Planspiegel.	Plane mirror.
Espejo con rótula.	Miroir à rotule.	Kugelspiegel.	Ball-seat mirror.
Espejo de dibujo.	Miroir à dessiner.	Zeichenspiegel.	Drawing mirror.
Espejo de proyección.	Miroir à projection.	Projectionsspiegel.	Projection mirror.
Espejo de reflexión.	Miroir de renvoi.	Umlenkspiegel.	Reflecting mirror.
Espesor del cubreobjetos.	Épaisseur du couvre-objet.	Deckglasdicke.	Thickness of cover glass.
Espiroquetas.	Spirochète.	Spirochäte.	Spirochaete.
Estativo.	Statif.	Stativ.	Stand.
Estereomicroscopio.	Microscope stéréoscopique.	Binokularlupe. Stereo-Mikroskop.	Stereoscopic magnifier. Stereoscopic microscope.
Estereoscopia.	Stéréoscopie.	Stereoskopie.	Stereoscopy.
Estrioscopia.	Strioscopie.	Schlierenmethode.	Track method.
Estructura.	Structure.	Struktur.	Structur. Texture.
Estuche.	Coffret; Étui.	Schrank; Behälter.	Case. Cabinet; Container.
Exposición sucesiva por bandeo.	Expositions succesives par bandes.	Streifenbelichtung.	Strip exposure.
Extracto.	Extrait.	Brühe.	Broth.
Factor de aumentos.	Facteur de grossissement.	Vergrösserungsfaktor.	Magnifying power.
Factor de reflexión.	Facteur de réflexion.	Reflexionsvermögen.	Reflecting power. Reflectance.
Factor de transmisión.	Facteur de transmission.	Durchlässichkeit.	Transmittance.
Fase.	Phase.	Phase.	Phase.
Fenómeno de difracción.	Phénomène de diffraction.	Beugungsbild.	Diffraction pattern.
Ficha.	Fiche.	Stecker.	Plug.
Fijación.	Fixation. fixage.	Fixierung.	Fixing. Fixation.
Fijador.	Fixateur.	Fixierflüssigkeit.	Fixing liquid.
Filamento.	Filament.	Glühfaden.	Filament.
Filtro.	Filtre.	Filter.	Filter.
Filtro anticalórico.	Filtre anti-calorifique.	Wärmeschutzfilter.	Heat absorbing filter.
Filtro de detención.	Filtre d'arrêt.	Spersfilter.	Barrier filter.

Filtro de interferencias.	Filtre interférentiel.	Interferenzfilter.	Interference filter.
Filtro de polarización.	Filtre de polarisation.	Polarisationsfilter.	Polarizing filter.
Flash.	Flash.	Blitzlicht.	Flash-light.
Flujo luminoso.	Fond clair; Flux lumineux.	Hellfeld; Lichtstrom.	Bright field; Luminous flux.
Fluorescencia con luz azul.	Fluorescence en lumière bleue.	Blaulicht-Fluoreszenz.	Blue-light fluorescence.
Fluorina.	Fluorine.	Fluorit.	Fluorite.
Fluorocromo.	Fluorochrome.	Fluorochrom.	Fluorescent dye or stain.
Foco de la imagen.	Foyer image.	Bildbrennpunkt.	Rear focus.
Foco del material lumínico.	Rendement de la source lumineuse.	Lichtquellerrausbente.	Light source efficiency.
Formación.	Formation.	Entstehung (Bildung).	Formation.
Formación de la imagen.	Formation de l'image.	Bilderzeugung.	Formation of an image.
Fórmula óptica.	Formule optique.	Linsengleichung.	Lens equation.
Fosforescente.	Phosphorescence.	Phosphoreszenz.	Phosphorescence.
Fotómetro.	Posemètre.	Belichtungsmesser.	Exposure meter.
Fotosensibilidad.	Photosensibilité.	Lichtempfindlichkeit.	Photosensitivity.
Frenable.	Freinable.	Bremsbar.	Capable of being braked.
Freno.	Frein.	Bremse, Klemme.	Brake, clipper.
Frotis o extensión.	Frottis.	Ausstrichpräparat.	Smear.
Frotis sanguíneo.	Frottis sanguin.	Blutausstrich.	Blood film or smear.
Fusible.	Fusible.	Sicherung.	Fuse.
Gelatina glicerinada.	Gélatine glycérinée.	Glyzeringelatine.	Gelatinous glycerin.
Glicerina.	Glycérine.	Glyzerin.	Glycerin, Glycerol.
Grado.	Degré.	Grad.	Degree.
Grado de acidez.	Degré d'acidité.	Säuregrad.	Acidity.
Grado de transparencia.	Domaine de transparence.	Durchlässigkeitbereich.	Range of free transmission.
Graduación.	Graduation.	Gradeinteilung.	Graduation, Division.
Gran angular.	Grand angle.	Weitwinkel.	Wide field, Wide angle.
Guía.	Guide.	Orientierungsstift.	Guide pin.
Guía con resorte.	Glissière à ressort.	Führungsleiste.	Slideway with spring load.
Guía de deslizamiento.	Coulisse.	Gleitfläche.	Sliding surface.
Haz lumínico.	Faisceaux lumineux.	Büschel (Licht).	Beam of rays.
Hematímetro.	Hématimètre.	Blutzählkammer.	Blood chamber, Hemacytometer.
Hilo eléctrico.	Fil électrique.	Kabel.	Cable.
Hoja.	Feuille.	Folie.	Film, Foil.
Iluminación.	Ilumination.	Beleuchtung.	Illumination.
Iluminación anular.	Éclairage annulaire.	Ringbeleuchtung.	Annular illumination.
Iluminación crítica.	Éclairage critique.	Kritische Beleuchtung.	Critical illumination.
Iluminación directa.	Éclairage direct.	Direkte Beleuchtung.	Direct illumination.
Iluminación electrónica.	Éclairage électronique.	Elektronenblitz.	Electronic flashlight.
Iluminación incidente.	Éclairage incident.	Auflichtbeleuchtung.	Vertical illumination.
Iluminación incorporada.	Éclairage incorporé.	Einbaubeleuchtung.	Built-in illumination.
Iluminación indirecta.	Éclairage indirect.	Indirekte Beleuchtung.	Indirect illumination or light.
Iluminación solar.	Éclairage solaire.	Beleuchtung mit Sonnenlicht.	Sunlight illumination.
Iluminación de campo claro.	Éclairage à fond clair.	Hellfeldbeleuchtung.	Bright field illumination.
Iluminación de campo oscuro.	Éclairage à fond noir.	Dunkelfeldbeleuchtung.	Dark field illumination.
Iluminador vertical.	Illuminateur vertical.	Auflicht-Kondensor.	Vertical illuminator, Epi-illuminator.
Ilustración, Imagen.	Illustration, Image.	Abbildung.	Image, Picture.
Imagen parásita.	Image parasite.	Doppelbild.	Falx image.
Imagen reflejada.	Image réfléchie.	Spiegelbild.	Mirror image.
Imagen de difracción.	Image de diffraction.	Beugungsbild, Diffraktionsbild.	Diffraction picture or image.
Impermeable al polvo.	Étanche à la poussière.	Staubdicht.	Dustproof.
Inclusión.	Inclusion.	Einbettung.	Embedding.

Incorporado.	Incorporé.	Eingebaut.	Built-in.
Índice de refracción.	Indice de réfraction.	Brechungszahl. Brechungsindex.	Refractive index. Refractive indice.
Infrarrojo.	Infra-rouge.	Ultrarot, infrarot.	Infra-red.
Inmersión homogénea.	Immersion homogène.	Œlimmersion.	Oil immersion.
Insertado.	Inséré.	Einsatz.	Insert.
Instantáneo.	Instantané.	Momentaufnahme.	Snapshot.
Instrumento de medición.	Instrument de mesure.	Messinstrument.	Measuring tool or apparatus.
Intensidad.	Intensité.	Helligkeit.	Brightness.
Intensidad lumínica.	Intensité lumineuse.	Leuchtdichte, Lichtstärke.	Luminous density, light intensity.
Intercambiable.	Interchangeable.	Auswechselbar.	Interchangeable.
Interferencia.	Interférence.	Inteferenz.	Interference.
Interrupción.	Interrompre.	Ausschalten.	To break, disconnect.
Interruptor.	Interrupteur.	Kippschalter.	Tumbler or switch.
Intervalo.	Intervalle.	Bereich.	Range.
Inversión de la imagen.	Redresseur d'image.	Bildaufrichtend.	Image-erecting.
Inversor de la imagen.	Redressement de l'image.	Bildaufrichtung.	Image erection.
Investigación.	Recherche, Investigation.	Forschung.	Research, Study, Investigation.
Iris, Diafragma iris.	Iris, Diaphragme iris.	Blende.	Light stop, Iris diaphragm.
Laboratorio.	Laboratoire.	Labor.	Laboratory.
Lámina.	Lame.	Lamelle.	Lamella.
Lámina o placa de fases.	Lame de phase.	Phasenplatte.	Phase plate.
Lámina de caras paralelas.	Lame à faces parallèles.	Planscheibe.	Face-plate.
Lámpara fija.	Lampe à fiche.	Anstecklampe.	Plug-in lamp.
Lámpara fluorescente.	Lampe fluorescente.	Glimmlampe.	Glow lamp.
Lámpara incandescente.	Lampe à incandescence.	Glühbirne.	Incandescent bulb.
Lámpara de bajo voltaje.	Lampe à bas voltage.	Niedervoltlampe.	Low voltage lamp.
Lámpara de conexión directa.	Lampe à branchement direct.	Netzanschlusslampe.	Main connection lamp.
Lámpara de cuarzo.	Lampe en quartz.	Quarzlampe.	Quartzlamp.
Lámpara de epiiluminación.	Épilampe.	Epilampe.	Overhead illuminator.
Lámpara de filamento espiral.	Lampe à filament spiralé.	Bandlampe.	Ribbon filament lamp.
Lámpara de microscopio.	Lampe pour microscope.	Mikroskopierlampe.	Microscop lamp.
Lámpara de pie.	Lampe à socle.	Einstecklampe.	Socket lamp.
Lámpara de vapor de mercurio de alta presión.	Lampe à vapeur de mercure haute pression.	Quecksilberhochdruck-dampflampe.	High pressure mercury vapour lamp.
Latitud de exposición.	Latitude de pose.	Belichtungsspielraum.	Lattitude of exposure.
Latón.	Laiton.	Messing.	Yellow brass, Brass.
Lente biselada.	Lentille biseautée.	Facettierte Linse.	Bevel edged lens.
Lente convergente.	Lentille convergente.	Sammellinse.	Convergent or converging lens, Positive lens.
Lente convexa.	Lentille convexe.	Konvexe Linse.	Convex lens.
Lente correctora.	Lentille correctrice.	Korrektionslinse.	Correcting lens.
Lente divergente, o lente negativa.	Lentille divergente, ou Lentille négative.	Zerstreuungslinse.	Divergent or diverging lens, Dispersing lens, Negative lens.
Lente frontal.	Lentille frontale.	Frontlinse.	Frontlens.
Lente montada.	Lentille montée.	Gefasste Linse.	Mounted lens.
Lente oblicua.	Lumière oblique.	Schräglicht.	Oblique light.
Lente ocular.	Lentille oculaire.	Augenlinse.	Eye lens.
Lente pegada.	Lentille collée.	Gekittete Linse.	Cemented lens.
Lente planoconvexa.	Lentille plan-convexe.	Plankonvexe Linse.	Plane-convex lens.
Lente posterior.	Lentille postérieure.	Hinterlinse.	Back-lens.
Lente sencilla.	Lentille simple.	Einzellinse.	Single lens.
Limpieza.	Netteté.	Schärfe.	Sharpness, Sharp definition.
Longitud de onda.	Longueur d'onde.	Wellenlänge.	Wave length.
Luminiscencia.	Luminescence.	Lumineszenz.	Luminescence.

Lupa.	Loupe.	Lupe.	Magnifier. Magnifying glass or lens.
Lupa binocular.	Loupe binoculaire.	Binokularlupe.	Binocular magnifier.
Lupa de enfoque.	Loupe de mise au point.	Einstellupe.	Focusing magnifier.
Luz artificial.	Lumière artificielle.	Kunstlicht.	Artificial light.
Luz difusa.	Lumière diffusée.	Diffuses Licht.	Diffused light.
Luz incidente.	Lumière incidente.	Einfallendes Licht.	Incident light.
Luz oblicua.	Lumière oblique.	Schräglicht.	Oblique light.
Luz parásita.	Lumière parasite.	Ueberstrahlung.	Irradiation.
Luz polarizada.	Lumière polarisée.	Plarisiertes Licht.	Polarized light.
Luz transmitida.	Lumière transmise.	Durchlicht, Durchfallendes Licht.	Transmitted light.
Magnético.	Magnétique.	Magnetisch.	Magnetical.
Malla.	Filet.	Gewinde.	Winding, Coil, Thread.
Manantial lumínico.	Source lumineuse.	Lichtquelle.	Light source.
Mango.	Manche.	Griff.	Handle.
Marcador. ,	Marqueur.	Objektmarkierer, Markierobjektiv.	Object marker, Marking objectif.
Material plástico.	Matière plastique.	Kunstharz.	Synthetic resin, Plastic.
Medida de longitud.	Mesure des longeurs.	Längenmessung.	Measure, Length.
Medio de inclusión.	Milieu d'inclusion.	Einbettungsmedium.	Mounting or embedding material.
Medio de montaje.	Milieu de montage.	Einschlussmittel.	Mouting medium.
Mica.	Mica.	Glimmer.	Mica.
Microdisección.	Microdissecteur.	Mikrodissektionsapparat.	Microdissector.
Microfotografía.	Microphotographie.	Mikrophotographie.	Photomicrography.
Micromanipulador.	Micromanipulateur.	Mikromanipulator.	Micromanipulator.
Micrómetro.	Micromètre.	Mikrometer.	Micrometer.
Micrómetro objetivo.	Micromètre objectif.	Objektmikrometer.	Stage micrometer.
Micrómetro ocular.	Micromètre oculaire.	Okularmikrometer.	Eyepiece micrometer.
Micrómetro de cuadrícula.	Micromètre à cadran.	Messuhr.	Dial gauge.
Micropipeta.	Micropipette.	Mikorpipette.	Micropipette.
Microscopia.	Microscopie.	Mikroskopie.	Microscopy.
Microscópico.	Microscopique.	Mikroskopisch.	Microscopical.
Microscopio.	Microscope.	Mikroskop.	Microscope.
Microscopio auxiliar.	Microscope auxiliaire.	Einstellmikroskop, Hilfsmikroskop.	Focusing microscope. Auxiliary microscope.
Microscopio electrónico.	Microscope électronique.	Elektronenmikroskop, Übermikroskop.	Electron microscope.
Microscopio escolar.	Microscope scolaire.	Kursmikroskop.	School microscope.
Microscopio de campo oscuro.	Microscope à fond noir.	Ultramikorskop.	Ultramicroscope. Darkfield Microscope.
Microscopio de comparación.	Microscope de comparaison.	Vergleichsmikroskop.	Comparison microscope.
Microscopio de disección.	Microscope à dissection.	Präpariermikroskop.	Dissecting microscope.
Microscopio de fluorescencia.	Microscope à fluorescence.	Fluoreszenzmikroskop.	Fluorescence microscope.
Microscopio de investigación.	Microscope de recherche.	Forschungsmikroskop.	Research microscope.
Microscopio de laboratorio.	Microscope de laboratoire.	Labormikroskop.	Laboratory microscope.
Microscopio de luz polarizada.	Microscope polarisant.	Polarisationsmikroskop.	Polarizing microscope.
Microscopio de medición.	Microscope de mesure.	Messmikroskop.	Measuring microscope.
Microscopista.	Microscopiste.	Mikroskopiker.	Microscopist.
Micrótomo de deslizamiento.	Microtome à glissière.	Schlittenmikrotom.	Sliding microtome.
Modificador de intensidad.	Modificateur d'intensité.	Lichtregler.	Light modulator.
Moho.	Moisissure.	Pilz.	Fungus.
Moleta.	Moleter.	Rändeln.	To knurl, to mill.
Monocular.	Monoculaire.	Monokular.	Monocular.
Montado.	Monter.	Montieren.	To mount.
Montura.	Monture.	Fassung.	Holder, Socket.
Montura regulable.	Monture réglable.	Einstellfassung.	Focusing mount.

Montura a bayoneta.	Monture à baïonnette.	Bayonettfassung.	Bayonet mount.
Montura telescópica.	Monture télescopique.	Federfassung.	Spring mount.
Montura de corrección.	Monture à correction.	Korrektionsfassung.	Correction mount.
Montura del objetivo.	Monture de l'objectif.	Objektivfassung.	Lens attachment. Objective or lens mount.
Montura en lira, o en tenedor.	Monture en fourche, en lyre.	Gabelfassung.	Fork mount.
Movimiento.	Mouvement.	Bewegung.	Movement, Motion.
Movimiento rápido.	Mouvement rapide.	Grossverstellung.	Coarse motion.
Movimiento a cremallera.	Mouvement à crémaillère.	Zahntrieb.	Rack and pinion adjustment.
Movimiento de vaivén.	Mouvement de va-et-vient.	Hin- und Herbewegung.	To and from motion.
Muelle.	Soufflet, Ressort.	Balgen, Feder.	Bellow, Spring.
Muestra.	Échantillon.	Muster.	Sample.
Navaja.	Rasoir.	Rasiermesser.	Razor.
Neutro.	Neutre.	Neutral.	Neutral.
Nicol.	Nicol.	Nicol'sches Prisma.	Nicol prism.
Numeración.	Numération.	Numerierung.	Counting, Numbering.
Objetivo.	Objectif.	Objektiv.	Objective glass, Lens.
Objetivo apocromático.	Apochromat.	Apochromat.	Apochromatic objective.
Objetivo gran angular.	Objectif grand angulaire.	Weitwinkelobjektif.	Wide field objective, Wide angle objective.
Objetivo de inmersión.	Objectif à immersion.	Immersionsobjektiv.	Oil-immersion objective.
Objetivo de proyección.	Objectif de projection.	Projektionsobjektiv.	Projection lens.
Objeto.	Object.	Objekt.	Object, Specimen.
Obturador.	Obturateur.	Verschluss.	Shutter.
Obturador de placas.	Obturateur de plaque.	Schlitzverschluss.	Focal plane shutter.
Ocular.	Oculaire.	Augenlinse.	Eye lens.
Ocular comparador.	Oculaire comparateur.	Vergleichsokular.	Comparison eyepiece.
Ocular goniométrico.	Oculaire goniométrique.	Goniometerokular, Winkelmessokular.	Goniometer-eyepiece.
Ocular con rejilla en cruz.	Oculaire à réticule en croix.	Fadenkreuzokular.	Cross-hair eyepiece.
Ocular gran angular, Ocular de gran campo.	Oculaire grand angulaire, Oculaire grand champ.	Weitwinkelokular.	Wide field eyepiece, Wide angle eyepiece.
Ocular de centrado.	Oculaire de centrage.	Hilfmikroskop.	Centering telescope.
Ocular de cuadrícula.	Oculaire de cadrage.	Bildfeldokular.	Size indicating eyepiece.
Ocular de demostración.	Oculaire de démonstration.	Zeigerokular.	Pointer eyepiece.
Ocular de enfoque.	Oculaire de mise au point.	Einstellfernrohr.	Focusing telescope.
Ocular de medición.	Oculaire de mesure.	Messokular.	Measuring eyepiece.
Ocular de regulación.	Oculaire de visée.	Einstellokular.	Focusing eyepiece.
Onda.	Onde.	Welle.	Wave.
Óptica.	Optique.	Optik.	Optical system.
Orden.	Ordre.	Ordnung.	Order, Class.
Ordenado.	Ordonée.	Ordinate.	Ordinate.
Orientación.	Orientation.	Orientierung.	Orientation.
Palanca.	Levier.	Hebel.	Lever.
Palanca de bloqueo.	Levier de blocage.	Klemmhebel.	Clamp lever.
Pantalla fluorescente.	Écran fluorescent.	Fluoreszenzschirm.	Fluorescent screen.
Parafina.	Paraffine.	Paraffin.	Paraffin.
Parafocal.	Parafocal, parfocal.	Abgestimmt.	Parfocal.
Paralaje.	Parallaxe.	Parallaxe.	Parallax.
Paralelo.	Parallèle.	Parallel.	Parallel.
Paso de rosca.	Pas de vis.	Gewinde.	Winding, Coil, Thread.
Película.	Film.	Film, Folie.	Film, foil.
Película pack, Película plana, Película rígida.	Film-pack. Film plan, Film rigide.	Filmpack.	Filmpack.
Película polarizante.	Film polarisant.	Polarisationsfolien.	Polarization foil.
Pera de caucho.	Poire en caoutchouc.	Gummiblasebalg.	Rubber bellow.
Pérdida de contraste.	Perte de contraste.	Kontrastverlust.	Loss of contrast.
Pérdidas.	Dégât.	Beschädigung.	Damage.

Período.	Période.	Bildwechselfrequenz.	Frame frequency.
Piedra de afilar.	Pierre à aiguiser.	Schleifstein.	Grindstone, Whetstone.
Pieza desajustada.	Pièce détachée.	Einzelteil.	Component part.
Pieza de ensamblaje.	Pièce d'assemblage.	Aufsatz.	Attachment.
Pieza de recambio.	Pièce de rechange.	Ersatzteil.	Spare part.
Pincel para sacar el polvo.	Pinceau à épousseter.	Abstaubpinsel.	Dusting brush.
Piñón.	Pignon.	Ritzel.	Pinion, Driver.
Pipeta graduada.	Pipette graduée.	Messpipette.	Graduated pipette.
Placa.	Plaque.	Platte.	Plate.
Placa micrométrica.	Plaque micrométrique.	Mikrometerplättchen.	Micrometer disc.
Placa de base.	Plaque de base.	Grundplatte.	Base plate, Bearing platet.
Placa de cobertura.	Plaque de couverture.	Abdeckplatte.	Cover plate.
Placa de difracción.	Plaque de diffraction.	Beugungsscheibchen.	Diffraction plate.
Placa de fases.	Plaque de phase.	Phasenplatte.	Phase plate.
Placa de vidrio deslustrado.	Plaque en verre dépoli.	Mattglasscheibe.	Ground glass plate.
Plano focal.	Plan focal.	Brennebene.	Focal plane.
Plano objeto.	Plan objet.	Präparatebene.	Specimen plane.
Plano de enfoque.	Plan de mise au point.	Einstellebene.	Focusing plane, Focal plane.
Plano de polarización.	Plan de polarisation.	Polarisationsebene.	Plane of polarization.
Plano de la imagen.	Plan image.	Bildebene.	Image plane.
Plateado.	Argenture.	Versilberung.	Silvercoating.
Platina.	Platine.	Mikroskoptisch, Objekttisch.	Microscope stage, Object-stage.
Platina calefactora.	Platine chauffante.	Heiztisch, Wärmetisch.	Heating stage, Hot stage.
Platina giratoria.	Platine tournante.	Drehtisch.	Turning table.
Platina inmóvil.	Platine à frottement gras.	Glettisch.	Sliding stage.
Platina con carro móvil.	Platine à chariot.	Kreuztisch.	Mechanical stage.
Poder amplificante.	Puissance.	Vergrösserungskraft.	Magnifying power.
Poder rotatorio.	Pouvoir rotatoire.	Drehungsvermögen, Optische Drehung.	Optical rotary power.
Poder separador, Poder de resolución.	Pouvoir séparateur, Pouvoir résolvant.	Auflösungsvermögen.	Resolving power.
Poder de acomodación.	Pouvoir d'accommodation.	Akkomodationsfähigkeit.	Power of accommodation.
Polarímetro.	Polarimètre.	Polarimeter.	Polarimeter.
Polarización.	Polarisation.	Polarisation.	Polarization.
Polarizado.	Polariser.	Polarisieren.	To polarize.
Polarizador.	Polariseur.	Polarisator.	Polarizer.
Polvo.	Poudre.	Pulver.	Powder.
Portaclichés.	Pose-cliché.	Aufnahme.	Picture, Photography.
Portaespejos.	Porte-miroir.	Spiegelträger.	Mirror carrier.
Portafiltros.	Porte-filtre.	Filterkästchen.	Filter-box, Filter carrier.
Portaobjetos.	Porte-objet.	Objektträger.	Slide, Object slide.
Potencia.	Potence.	Arm eines Gerätes.	Limb, arm.
Precisión de medición.	Précision des mesures.	Messgenauigkeit.	Precision of test.
Preparación.	Preparation.	Präparierarbeit.	Dissecting work.
Preparado.	Préparation.	Präparat.	Slide.
Presión.	Pression.	Druck.	Pressure.
Presión osmótica.	Pression osmotique.	Osmotischer Druck.	Osmotic pressure.
Prisma.	Prisme.	Prisma.	Prism.
Prisma de reflexión.	Prisme de renvoi.	Umlenkprisma.	Deflecting prism.
Probeta.	Éprouvette.	Reagenzglas.	Test tube.
Producción de la imagen.	Production de l'image.	Bilderzeugung.	Formation of an image.
Profundidad del campo.	Profondeur de champ.	Schärfentiefe, Tiefenschärfe.	Depth of field.
Proyección.	Projection.	Bildentwerfung.	Projection.
Puesta a punto.	Mettre au point.	Einstellen.	To focus.
Puesta fuera de circuito.	Mettre hors circuit.	Ausschalten.	To break, disconnect.
Pulverizar.	Pulvériser.	Pulverisieren.	To crush.
Punto.	Point.	Punkt.	Point.
Punto de fusión.	Point de fusion.	Schmelzpunkt.	Melting point.
Punto de referencia.	Repérage.	Feststellung.	Fixing.
Puntual.	Ponctuel.	Punktförmig.	Punctiform.

Pupila de entrada.	Pupille d'entrée.	Eintrittspupille.	Entrance pupil.
Pupila de salida.	Pupille de sortie.	Austrittspupille.	Exit pupil.
Puño.	Poignée.	Griff.	Grip, Handle.
Radio.	Rayon.	Strahlenbüschel, Lichtbüschel.	Pencil or beam of rays, Beam.
Rasguño.	Éraflure.	Kratzer.	Scratch.
Rayo calorífico.	Rayonnement calorifique.	Wärmestrahl.	Heat ray, Thermal ray.
Reactivo.	Réactif.	Reagens.	Reagent.
Recomendado.	Recommandé.	Empfehlenswert.	Recommended.
Red.	Réseau.	Strichplatte, Gitter.	Graticule, Grating, Grid.
Red eléctrica.	Réseau électrique.	Lichtnetz.	Supply line, Lightning mains.
Red de difracción.	Réseau de diffraction.	Diffraktionsgitter.	Diffraction grating.
Reflexión.	Réflexion.	Reflexion.	Reflection.
Refracción.	Réfraction.	Brechkraft, Lichtbrechung, Refraktion.	Power of refraction, Refraction of light, Refraction.
Refringente.	Réfrigent.	Lichtbrechend.	Light-refracting.
Regla empírica.	Règle empirique.	Faustregel.	Rule of thumb, Rough rule.
Regulable.	Réglabe.	Einstellbar, Justierbar, Regulierbar.	Adjustable, Focusable.
Regulado.	Régler.	Feinstellen, Einstellen.	To adjust, To set, regulate.
Rejilla.	Grille.	Gitter.	Grid.
Reostato.	Rhéostat.	Drehwiderstand.	Rheostat.
Resina.	Résine.	Dammarharz.	Resin, Gum.
Resistencia.	Résistance.	Widerstand.	Resistor.
Retículo en cruz.	Réticule en croix.	Fadenkreuz.	Cross-wires, cross-hairs.
Retraso de fase.	Retard de phase.	Phasenverzögerung.	Phase retardation.
Revólver.	Revolver.	Mikroskoprevolver.	Revolving nosepiece.
Rotación del plano de polarización.	Rotation du plan de polarisation.	Polarisations-besendrehung.	Rotation of plane of polarization.
Rotativo.	Rotatif.	Drehbar.	Rotating, Revolving.
Sangre.	Sang.	Blut.	Blood.
Sección transversal.	Section transversale.	Querschnitt.	Cross section.
Seleccionador de voltaje.	Sélecteur de tension.	Netzspannungswähler, Spannungswähler.	Voltage selector, Voltage supply.
Semiapocromático.	Semi-apochromat.	Semi-Apochromat.	Semi-apochromatic objective.
Sensibilidad.	Sensibilité.	Lichtempfindlichkeit.	Light, Sensitity, Speed.
Sensibilidad espectral del ojo.	Sensibilité spectrale de l'oeil.	Augenfarbenempfindlichkeit.	Color spectral sensitivity of eye, Spectral response of eye.
Separación de los ojos, Distancia interpupilar.	Écartement des yeux, Distance interpupillaire.	Augenabstand.	Interocular distance, Interpupillary distance.
Ser fluorescente.	Être fluorescent.	Fluoreszieren.	To fluoresce, luminesce.
Similor.	Simili.	Gerastertes Bild.	Hilftone process image.
Sistema dióptrico.	Système dioptrique.	Dioptrieneinstellung.	Diopter focusing mount.
Sistema semiapocromático.	Système semi-apochromatique.	Fluoritlinsensystem.	Semiapochromatic-lens system, Fluorite lens system.
Sistema de enfoque.	Système de mise au point.	Einstellvorrichtung.	Focusing mechanism, Adjustment.
Sistema de fijación rápida.	Système de fixation rapide.	Schnellwechselfassung.	Quick-change mount.
Sistema de regulación.	Système de réglage.	Justiervorrichtung.	Adjusting device.
Sistema para la formación de la imagen.	Système pour la formation de l'image.	Abbildungssystem.	Image-forming system.
Sobreexposición.	Sur-exposition.	Ueberbelichtung.	Over-exposure.
Sobreplatina inmóvil.	Surplatine amovible.	Objektführer.	Attachable mechanical stage.
Sombra.	Sombre.	Dunkel.	Dark.
Sombrero de protección.	Coiffe de protection.	Staubschutzhaube.	Dust hood.
Soporte del condensador.	Support du concentrateur.	Kondensorträger.	Condenser carrier.

Soporte del espejo.	Support du miroir.	Spiegelträger.	Mirror carrier.
Superficie plateada.	Argenté à la surface.	Oberflächenversilbert.	Surface silvered.
Superficie reflectora.	Surface réfléchissante.	Oberflächenversilbert.	Surface silvered.
Tamaño de la imagen.	Format de l'image.	Bildformat.	Size of image, picture size.
Tambor graduado.	Tambour gradué.	Messtrommel.	Micrometer drum.
Telescópico.	Télescopique.	Ausziehbar.	Telescopic, Extensible, Draw.
Temperatura de color.	Température de coleur.	Farbtemperatur.	Color temperature.
Tensión del resorte.	Tension du réseau.	Netzspannung.	Power-supply voltage, Mains-voltage.
Tiempo muerto.	Temps mort.	Toter Gang.	Lost motion (of a screw).
Tiempo de exposición.	Temps de pose.	Belictungsdauer, Belichtungszeit.	Exposure time.
Toma.	Prise.	Netzanschluss.	Power supply.
Toma eléctrica.	Prise eléctrique.	Anschlussdose, Steckdose.	Junction box, Wall socket, Socket, Plug box.
Toma de corriente.	Prise de courant.	Steckdose.	Socket, Plug box, Wall socket, Wall plug.
Tope.	Butée.	Anschlag.	Stop.
Tornillo micrométrico.	Vis micrométrique.	Mikrometerschraube.	Micrometer screw.
Tornillo de aserrado.	Vis de serrage.	Klemmschraube.	Setcrew, Clamping or attachment screw.
Tornillo de enfoque.	Vis de centrage.	Zentrierschraube.	Centering screw.
Tornillo de obturación.	Vis d'obturation.	Deckschaube.	Cover screw.
Tornillo de resorte.	Vis à pompe.	Federstift.	Spring pin.
Transformador.	Transformateur.	Transformer.	Transformer.
Transformador regulable.	Transformateur réglable.	Reguliertransformer.	Regulating transformer.
Transparencia.	Transparence.	Durchsichtigkeit.	Transparency.
Transparente.	Transparent.	Durchsichtig.	Transparent.
Tratado.	Traiter.	Vergüten.	To coat (a lens).
Tratamiento antirreflectante.	Traitement anti-reflect.	Reflexschutz.	Coating, blooming.
Trayectoria óptica.	Chemin optique.	Strahlenverlauf.	Path of rays.
Trazo.	Trait.	Strich.	Line, Streak, Stria.
Triturar.	Broyer.	Pulverisieren.	To crush.
Tubo.	Tube.	Rohr.	Tube, Tubus.
Tubo derecho.	Tube droit.	Geradtubus.	Straight tube.
Tubo ocular.	Tube oculaire.	Okulartubus.	Eyepiece tube.
Tubo telescópico.	Tube télescopique.	Ausziehtubus.	Draw-tube.
Ultravioleta.	Ultra-violet.	Ultraviolett.	Ultra-violet.
Unicelular.	Unicellulaire.	Einzellig.	Monocellular, Unicellular.
Unidad de medición.	Unité de mesure.	Masseinhalten.	Units of measurement.
Vasculante.	Basculant.	Ausklappbar.	Swinging out.
Ventanilla del chasis.	Volet de châssis.	Kassettenschieber.	Shutter of dark slide.
Vibración limpia.	Vibration propre.	Eigenschwingung.	Natural vibration.
Vidrio deslustrado.	Verre dépoli.	Mattscheibe.	Ground glass plate.
Vidrio ocular.	Verre d'œil.	Augenlinse.	Eye lens.
Vidrio de campo.	Verre de champ.	Feldlinse.	Field lens.
Vidrio de cuarzo.	Verre de quartz.	Quarzglas.	Quartzglass.
Vidrio de lente.	Verre de lunette.	Brillenglas.	Lens.
Virtual.	Virtuel.	Virtuell.	Virtual.
Visibilidad.	Visibilité.	Sichtbarkeit.	Visibility.
Visible.	Visible.	Sichtbar.	Visible.
Xilol.	Xylène.	Xylol.	Xylol, Xylene.
Zona.	Zone.	Bereich.	Range.
Zócalo.	Socle.	Sockel.	Socket.

II. — CONSTANTES FISICOQUÍMICAS

Tabla I. — ESCALA CROMÁTICA DE NEWTON EN POLARIZACIÓN, cf. p. 155.

	Retraso	Polarizador y analizador cruzados	Polarizador y analizador paralelos
Primer orden	0μ,000	negro	blanco
	0μ,040	gris hierro	blanco
	0μ,097	gris lavanda	blanco amarillento
	0μ,158	gris azulado	blanco amarillento
	0μ,218	gris más claro	amarillo pardusco
	0μ,234	blanco verdoso	pardo
	0μ,259	blanco	rojo claro
	0μ,267	blanco amarillento	rojo carmín
	0μ,275	amarillo paja clara	pardo rojizo oscuro
	0μ,281	amarillo paja	violeta oscuro
	0μ,306	amarillo claro	índigo
	0μ,332	amarillo intenso	azul
	0μ,430	amarillo pardusco	azul grisáceo
	0μ,505	naranja rojizo	verde azulado
	0μ,536	rojo fuerte	verde pálido
	0μ,551	rojo más oscuro	verde amarillento
Segundo orden	0μ,565	púrpura	verde más claro
	0μ,575	violeta	amarillo verdoso
	0μ,589	índigo	amarillo oro
	0μ,664	azul celeste	anaranjada
	0μ,728	azul verdoso	anaranjado pardusco
	0μ,747	verde	rojo carmín
	0μ,826	verde más claro	púrpura claro
	0μ,843	verde amarillento	púrpura violáceo
	0μ,866	amarillo verdoso	violeta
	0μ,910	amarillo puro	índigo
	0μ,948	anaranjado	azul oscuro
	0μ,998	anaranjado rojizo intenso	azul verdoso
	1μ,101	rojo violáceo oscuro	verde
Tercer orden	1μ,128	violeta azulado claro	verde amarillento
	1μ,151	índigo	amarillo sucio
	1μ,258	azul (tonalidad verdosa)	color carne
	1μ,334	verde mar	rojo pardusco
	1μ,376	verde brillante	violeta

Tabla II. — PRINCIPALES FILTROS UTILIZADOS EN FOTOMICROGRAFÍA (ver p. 62) .
Según Monpillard, Mointessier y colabs., en G. De Vaucouleurs *Ediciones de la Revista de Óptica,* París y Locquin, original.

Filtro anaranjado (Monpillard)

Bicromato potásico		0,4 g
Permanganato potásico		0,026 g
Agua destilada	hasta llegar a	100 ml

Grosor 10 mm. Transmite por encima de 5700 Å.

Filtro verde (Monpillard)

Sulfato de cobre $SO_4Cu, 5H_2O$		175 g
Bicromato potásico		17 g
Ácido sulfúrico concentrado		2 ml
Agua	hasta llegar a	500 ml

Grosor 10 mm. Transmite de 5500 a 5900 Å.

Filtro azul (Moitessier)

Sulfato de cobre $SO_4Cu, 5H_2O$		10 g
Agua	hasta llegar a	150 ml
Amoníaco hasta que se disuelva el precipitado		

Grosor 10 mm. Transmite de 4300 a 4800 Å.

Filtro policromático (Locquin)

Solución de reserva

Carbonato de neodime		6 g
Ácido acético		7 g
Agua	hasta llegar a	100 ml

Diluir 2 ml en 5 ml de agua en el momento de usar.
Filtro con bandas múltiples en el visible debido al incremento de contrastes de colores.

Tabla III. — FILTROS LÍQUIDOS PARA EL AISLAMIENTO DE LAS RAYAS DEL MERCURIO (ver p. 61)
(Según diversos autores, en G. de Vaucouleurs y colabs.)

Solución A e = 100 mm

Sulfato de cobre	4,4 g
Amoníaco (d = 0,88)	150 cm^3
Agua hasta llegar a	1000 cm^3

Solución B e = 100 mm

Sulfato de cobre	13 g
Bicromato potásico	0,44 g
Ácido sulfúrico	50 cm^3
Agua hasta llegar a	1000 cm^3

Solución C e = 10 mm

Verde malaquita	0,1 g
Agua hasta llegar a	100 cm^3

Solución J e = 10 mm

Solución alcohólica de rodamina 6J o 5G al 0,5 %	0,5 cm^3
Nitrobenceno	1,5 cm^3
Alcohol etílico de 95° hasta	10 cm^3

Solución N e = 10 a 100 mm según el uso
Nitrato de neodime en solución saturada (1)

Solución U e = 100 mm (2)

Sulfato de níquel	145 g
Sulfato de cobalto	41,5 g
Agua destilada hasta	1000 cm^3

Solución 1 e = 10 mm

Yodo	7,5 g
Tetracloruro de carbono	1000 cm^3

Solución 2 e = 20 mm

Clorhidrato de quinina	10 g
Agua hasta llegar a	1000 cm^3
(debe renovarse frecuentemente)	

Solución 3 e = 10 mm

Nitrato de sodio	75 g
Agua hasta llegar a	100 cm^3

Solución 4 e = 10 mm (3)

Nitrobenceno	1,5 cm^3
Alcohol etílico de 95° hasta llegar a	10 cm^3

(1) Puede obtenerse tratando el acetato de neodime con el ácido nítrico.
(2) Filtro transparente en el ultravioleta de $\lambda < 3500$ Å
(3) Filtro muy transparente en el visible para $\lambda > 4200$ Å y opaco para $\lambda < 4100$ Å.

Tabla IV. — FILTROS WRATTEN «N» PARA MICROGRAFÍA
(Según folleto de la casa Kodak)

Número y nombre	Banda transmitida (micras)	Coeficientes de exposición por emulsión		
		Orto	Pancro B	Pancro C
25 A	0,59	—	4	3
58 B.....	0,48 a 0,62	5	6	8
47 C 5	0,37 a 0,51	5	10	10
35 D	0,32 a 0,47 (*)	—	—	—
22 E.....	0,55	—	3	2
29 F.....	0,61	—	8	6
15 G	0,51	4	2	2
45 H	0,43 a 0,54	7	14	14
11 X 1	corrector (**)	3	3	4
B + G	0,51 a 0,62	7	10	9
B + E	0,55 a 0,62	—	80	75
B + H	0,48 a 0,54	70	90	100
G + H	0,51 a 0,54	220	300	350
A + D	0,65	—	60	40

(*) Y por encima de 0,65.
(**) Para iluminación con lámpara de tungsteno.

Tabla V. — PRINCIPALES COMBINACIONES DE FILTROS WRATTEN
(Según folleto de la casa Kodak)

Núm.	Designación	Media de banda transmitida	Transparencia	Amplitud de la banda(*)	Observaciones
35 + 45	D + H	4 500 Å 3 600 Å	6,5 % 1,0 %	450 Å 700 Å	
58 + 47	B2 + C5	4 975 Å	1,5 %	650 Å	
58 + 45	B2 + H	5 100 Å	10 %	700 Å	Los núms. 62 al 74 son más transparentes
75 + 61	η + N	5 100 Å	3 %	500 Å	
15 + 45	G + H	5 300 Å	3 %	600 Å	Corte hacia 5400 Å hacia las λ más cortas
58 + 15	B2 + G	5 500 Å	25 %	1 150 Å	Transmite por encima del 6700 Å
58 + 22	B2 + E	5 700 Å	7,5 %	800 Å	El núm. 89 es más selectivo y más transparente
25 + 58	A + B2	6 050 Å	0,75 %	600 Å	
25 + 35	A + D	λ>6 500 Å	30 %		

(*) Zona en la que el factor de transmisión es superior a la centésima de transparencia.

Tabla VI. — COMBINACIONES DE FILTROS AISLANDO LAS PRINCIPALES RAYAS DEL MERCURIO (ver p. 63)
(Según folleto de la casa Kodak; en G. de Vaucouleurs, op. cit.)

λ rayas	Filtros Wratten		Filtros Corning		Filtros líquidos (*)
	N.°	Transmis.	N.°	Transmis.	
3650 A	18 Å	28 %	5860 + 738	20 %	
4047			3060 +5970 +4308 (1)	11 % 8 %	A + 1 + 2
4358	76 θ +3389 (Corning)	4,5 %	3389 +5113 (3 mm)	8 %	A + 3 o J + 47 (Wratten)
4916	4 48 C2	13 %	3385 +5543	8 %	A + C
5461	77 +61 (1)	68 % 30 %	5120 +3484 +4303 (1)	40 % 10 %	B + N
5769 5791	22 +61 (1)	60 % 8 %	3480 +4303 (1)	72 % 4,5 %	B + J o J + 21 (Wratten) (3)
6234	26	74 %	2418 +9780 (2)	78 % 4,5 %	
6908	89	50 %	2030	77 %	

(*) Solución en cubetas separadas.
(1) Utilizar sólo en el caso de desear suprimir las rayas rojas de 6234 a 6908 Å.
(2) Utilizar sólo en el caso de desear suprimir las rayas de 6908 Å.
(3) Utilizar una emulsión orto C o pancro A si se desea eliminar las rayas rojas.

Tabla VII. — CUERPOS UTILIZADOS PARA ESCALONAR LAS PLATINAS DE ALTA TEMPERATURA. LOS PUNTOS DE FUSIÓN SE INDICAN EN GRADOS CELSIO (ver p. 81)

Cuerpo	Temp.	Cuerpo	Temp.	Cuerpo	Temp.
$NaNO_3$	308°	CsCl	646	$BaCl_2$	962
KNO_3	333	Mg	651	K_2CrO_4	975
CdI_2	385	NaI	651	NaF	992
Na_2CrO_4	392	Al	660	Au	1063
$K_2Cr_2O_7$	398	$MgCl_2$	712	Cu	1083
PbI_2	402	PbCl	715	PbS	1120
Zn	419,4	KI	723	SnO_2	1127
AgBr	434	KBr	730	$MgSO^-$	1185
AgCl	455	NaBr	755	CaF_2	1330
$CuCl_2$	498	$CaCl_2$	772	MgF_2	1396
$PbCl_2$	501	KCl	790	Si	1420
CdF_2	520	NiS	797	$NaAlO_2$	1650
KBF_4	529,5	NaCl	800,4	Zr	1700
NaCN	563,7	As	814	SiO_2	1710
B_2O_3	577	$PbCrO^-$	844	Pt	1755
$Ba(NO_3)_2$	592	Na_2CO_3	851	ZnS	1850
CiCl	614	LiF	870	Cr_2O_3	1900
Li_2CO_3	618	KF	880	CeO_2	1950
CsI	621	Na_2SO_4	884	La_2O_3	2000
KCN	634,5	K_2CO_3	891	UO_2	2176
CsBr	636	Ag	960,5	SrO	2430

Tabla VIII. — CONCENTRACIONES IÓNICAS EN FUNCIÓN DE LAS NORMALIDADES (ver p. 140)

Normalidades	pH	H^+ moles/l	OH^- moles/l
*N*HCl	0,0	1	10^{-14}
0,1 HCl	1,0	10^{-1}	10^{-13}
0,01 HCl	2,0	10^{-2}	10^{-12}
0,001 HCl	3,0	10^{-3}	10^{-11}
0,0001 HCl	4,0	10^{-4}	10^{-10}
0,00001 HCl	5,0	10^{-5}	10^{-9}
0,000001 HCl	6,0	10^{-6}	10^{-8}
Neutralidad	7,0	10^{-7}	10^{-7}
0,000001 NaOH	8,0	10^{-8}	10^{-6}
0,00001 NaOH	9,0	10^{-9}	10^{-5}
0,0001 NaOH	10,0	10^{-10}	10^{-4}
0,001 NaOH	11,0	10^{-11}	10^{-3}
0,01 NaOH	12,0	10^{-12}	10^{-2}
0,1 NaOH	13,0	10^{-13}	10^{-1}
N NaOH	14,0	10^{-14}	1

Tabla IX. — ESCALA DE pH DADA PARA LAS SIGUIENTES SOLUCIONES
(Dacie, 1950)

pH deseado	PO_4H_2K (M/5)	NaOH (N/5)
6,6	50 ml	17,8 ml
6,7	50 ml	21 ml
6,8	50 ml	23,7 ml
6,9	50 ml	26,5 ml
7	50 ml	29,6 ml

Tabla X. — FÓRMULAS Y PESOS MOLECULARES DE LOS PRINCIPALES COMPUESTOS UTILIZADOS EN LA PREPARACIÓN DE MEZCLAS TAMPONADAS INDICADAS (ver p. 140)
(Según Lillie, 1965)

Compuesto	Fórmula	Peso molecular
Acetato sódico, anhidro	CH_3COONa	82,04
Acetato sódico, cristalizado	$CH_3COONa,3\ H_2O$	136,09
Ácido acético	CH_3COOH	60,05
— bórico	$B(OH)_3$	61,84
— clorhídrico	HCl	36,465
— cítrico, anhidro	$C_3H_4OH(COOH)_3$	192,12
— cítrico, cristalizado	$C_3H_4OH(CCOH)_3,H_2O$	210,14
— fórmico	$HCOOH$	46,03
— maleico	$HOOCH=CHCOOH$	116,07
— nítrico	HNO_3	63,016
— oxálico	$(COOH)_2$	90,038
— sulfúrico	H_2SO_4	98,082
Amoníaco	NH_3	17,032
Borato sódico (bórax)	$Na_2B_4O_7,10\ H_2O$	381,43
Cloruro férrico, anhidro	$FeCl_3$	162,22
Cloruro férrico, cristalizado	$FeCl_3,6\ H_2O$	270,32
Cloruro potásico	KCl	74,553
Cloruro sódico	$NaCl$	58,448
Citrato sódico, cristalizado	$C_3H_4OH(COONa)_3,5,5\ H_2O$	357,18
Citrato sódico, granulado	$C_3H_4OH(COONa)_3,2\ H_2O$	294,12
Dietilmalonilurado sódico (veronal sódico)	$C_8H_{14}O_3N_2Na$	206,18
Glicina (glicocola)	H_2NCH_2COOH	75,07
Oxalato sódico	$Na_2C_2O_4$	134,004
Fosfato monopotásico	KH_2PO_4	136,09
Fosfato tripotásico	K_3PO_4	212,275
Fosfato monopotásico	NaH_2PO_4,H_2O	138,01
Fosfato disódico	Na_2HPO_4	141,98
Potasa	KOH	56,104
Sosa	$NaOH$	40,005
Trihidroximetilaminometano (tris)	$H_2NC(CH_2OH)_3$	121,14

Tabla XI. — ÍNDICES DE REFRACCIÓN DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES UTILIZADOS EN MICROSCOPIA. CLASIFICADOS POR ÍNDICES CRECIENTES

Cuando un mismo compuesto es citado dos veces, significa que su índice de refracción varía entre los dos límites señalados por las flechas

1,0003		Aire
1,323		Metanol (alcohol metílico)
1,329		(Alcohol etílico)
1,333		Agua destilada
1,335		Tirode
1,343		Agua de mar
1,350		Albúmina
1,354		Éter
1,364		Acetona
1,367		Alcohol etílico absoluto
1,372		Ácido acético glacial
1,378		Isopropanol
1,382		Alcohol polivinílico
1,386		Alcohol propílico
1,388		Alcohol butílico terciario
1,397		Glicerina y agua al 50 %
1,399		Alcohol butílico normal
1,40		Polivinil lactofenol
1,411		Cloruro cálcico al 90 % en agua
1,42	↓	Jarabe de Apathy
1,423		Dioxano
1,433		Fluorita
1,434		Sílice de diatomea
1,446		Cloroformo
1,46	↓	Vidrio de índices de refracción muy bajos
1,46		Aceite de cayeput
1,46	↓	Cuarzo
1,46	↓	Glicerina
1,464		Aceite de bergamota
1,47		Gelatina glicerinada
1,471		Aceite de parafina
1,473	↑	Glicerina concentrada
1,474		Esencia de trementina
1,476		Aceite de oliva
1,477		Metacrilato de isobutilo
1,478		Aceite de almendras
1,478		Bálsamo de camsal
1,478		Tricloroetileno
1,483		Diafanol
1,483		Euparal
1,483		Aceite de tomillo
1,484		Terpineol
1,485		Aceite de lino
1,485		Sandáraca (resina)
1,490		Aceite de castor
1,490		Fenoformo
1,494	↓	Aceite de orégano
1,495	↓	Metacrilato de isobutilo en xilol
1,495		Tolueno
1,497		Xilol
1,501		Sulfocarbonato de zinc en solución glicerinada
1,503		Benceno
1,504	↑	Aceite de orégano
1,504		Cloruro de cadmio en solución glicerinada
1,510		Aceite de cedro
1,510		Hidrato de cloral saturado en glicerina
1,510		Aceite de tomillo
1,51		Mersol
1,51		Aceite de madera de sándalo
1,512		Goma arábiga
1,515		Medio sintético neutro
1,515		Aceite de inmersión no resinoso
1,517		Anisol
1,52		Aceite de cedro espeso
1,526		Benzoato de metilo
1,52		Bálsamo de Tolu
1,52		Resina Dammar
1,52	↑	Jarabe de Apathy
1,525	↑	Metacrilato de isobutilo en xilol
1,526		Bálsamo del Canadá en xilol
1,527		Aceite de limón
1,528		Cubreobjetos de plástico
1,53		Salicilato de metileno
1,533		Esencia de girasol
1,535		Bálsamo del Canadá sólido
1,538		Creosota
1,544	↓	Clarite
1,545		Colofonia
1,549		Ácido fénico
1,55		Aceite de anís
1,55	↑	Cuarzo
1,553		Nitrobenceno
1,56		Yoduro de zinc en glicerina
1,56		Bromobenceno
1,567	↑	Clarite
1,578		Aceite de acacia
1,582	↓	Styrax
1,586		Aceite de anilina
1,615		Paracumarona indígena
1,617		Quinidina
1,619		Aceite de canela
1,62		Aceite de parafina saturado de bromonaftaleno
1,6293		Cedax
1,630		Sulfuro de carbono
1,63	↑	Styrax
1,65	↓	Naphtrax
1,654		Calcita, espato de Islandia
1,657	↓	Piperina
1,658		Monobromonaftaleno
1,63	↓	Hyrax
1,68	↑	Piperina
1,68		Yoduro doble de mercurio potásico en agua
1,70		Bromonaftaleno en yoduro de metilo
1,75		Solución de azufre en sulfuro de carbono
1,76		Yoduro de metilo
1,80	↑	Naphtrax
1,80		Glicerina yodomercúrica
1,81		Sirax
1,822	↑	Hyrax
1,96	↑	Vidrio de índice de refracción muy elevado
2,14	↓	Rejalgar
2,417		Diamante
2,549	↑	Rejalgar

Los índices de las mezclas, de las resinas y de los polímeros son aproximados, pueden variar según su procedencia.

Tabla XII. — BANDAS DE ABSORCIÓN ESPECTRAL DE LOS PRINCIPALES COLORANTES BIOLÓGICOS Y FILTROS WRATTEN RECOMENDADOS PARA OBTENER EL MÁXIMO CONTRASTE (ver p. 62)
(Documento de la casa Kodak)

Colorantes	Banda de absorción	Filtros
Fucsina ácida	0,53 a 0,56 μ	B & G
Fucsina básica	0,51 a 0,55	B & E
Azul de anilina	0,55 a 0,62	B & E
Carmín	0,50 a 0,57	B & G
Cristal violeta	0,55 a 0,61	B & G
Eosina	0,49 a 0,54	B & H
Hematoxilina Heidenhain	0,56 a 0,60	B & E
Verde Janus	0,56 a 0,64	B & E
Verde luz	0,60 a 0,66	F
Verde de metilo	0,62 a 0,65	F
Azul de metileno	0,60 a 0,62 y 0,65 a 0,68	A
Nigrosina	0,58 a 0,60	B & E
Rojo neutro	0,48 a 0,55	B & E
Azul de Nilo	0,56 a 0,65	B & E
Naranja II	0,46 a 0,51	C
Naranja G	0,47 a 0,50	C
Pironina	0,53 a 0,56	B & G
Safranina	0,48 a 0,54	G & H
Sudán III y IV	alrededor de 0,50	G & H
Tionina	0,56 a 0,61	B & E
Azul de toluidina	0,55 a 0,65	B & E

Tabla XIII. — TABLA DE GAY-LUSSAC PARA LA DILUCIÓN DEL ALCOHOL

Cantidad de agua en centímetros cúbicos que hay que añadir por 100 centímetros cúbicos de alcohol a diluir

Alcohol que se desea	Alcohol a diluir								
	100	99	98	97	96	95	94	93	92
95	6,50	5,15	3,83	2,53	1,25				
90	13,25	11,83	10,43	9,07	7,73	6,41	5,10	3,80	2,54
85	20,54	19,05	17,58	16,15	14,73	13,33	11,96	10,59	9,24
80	28,59	27,01	25,47	23,95	22,45	20,95	19,49	18,04	16,61
75	37,58	35,90	34,28	32,67	31,08	29,52	27,97	26,43	24,94
70	47,75	45,98	44,25	42,54	40,85	39,18	37,53	35,89	34,27
65	59,37	57,49	55,63	53,81	52	50,22	48,45	46,70	44,85
60	72,82	70,80	68,80	66,85	64,92	63	61,10	59,21	57,33
55	88,60	86,42	84,28	82,16	80,06	77,99	75,93	73,88	71,85
50	107,44	105,08	102,75	100,44	98,15	95,89	93,64	91,41	89,19
45	130,26	127,67	125,11	122,57	120,06	117,57	115,09	112,64	110,18
40	158,56	155,68	152,84	150,02	147,22	144,46	141,70	138,95	136,23
35	194,63	191,39	188,19	185,01	181,85	178,71	175,60	172,49	169,39
30	242,38	238,67	234,99	231,33	227,70	224,08	220,49	216,90	213,33
25	308,90	304,52	300,18	295,86	291,56	287,28	283,02	278,77	274,53
20	408,50	403,13	397,79	392,47	387,17	381,90	376,64	371,40	366,16
15	574,75	567,43	560,53	553,55	546,59	539,66	532,74	525,83	518,94
10	907,09	896,73	886,40	876,10	865,15	855,55	845,31	835,08	824,86

Alcohol que se desea	*Alcohol a diluir*								
	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6,56								
80	13,79	6,83							
75	21,89	14,48	7,20						
70	31,05	23,14	15,35	7,64					
65	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15				
60	53,65	44,48	35,44	26,47	17,58	8,76			
55	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,47		
50	84,71	73,90	63,04	52,43	41,73	31,25	20,47	10,35	
45	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	22,90	11,41
40	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59
30	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45
25	266,12	245,15	224,30	203,61	182,83	162,21	141,65	121,16	100,73
20	355,80	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10	804,50	753,65	702,89	652,21	601,60	551,06	500,50	450,19	399,85

Tabla XIV. — EQUIVALENCIAS EN GRADOS TERMOMÉTRICOS DE FAHRENHEIT Y CELSIO

F	C	F	C	F	C	F	C
+212	+100	+154	+67,78	+96	+35,55	+38	+3,33
211	99,44	153	67,22	95	35,00	37	2,78
210	98,89	152	66,67	94	34,44	36	2,22
209	98,33	151	66,11	93	33,89	35	1,67
208	97,78	150	65,55	92	33,33	34	1,11
207	97,22	149	65,00	91	32,78	33	0,55
206	96,67	148	64,44	90	32,22	32	0,00
205	96,11	147	63,89	89	31,67	31	–0,55
204	95,55	146	63,33	88	31,11	30	1,11
203	95,00	145	62,78	87	30,55	29	1,67
202	94,44	144	62,22	86	30,00	28	2,22
201	93,89	143	61,67	85	29,44	27	2,78
200	93,33	142	61,11	84	28,89	26	3,33
199	92,78	141	60,55	83	28,33	25	3,89
198	92,22	140	60,00	82	27,78	24	4,44
197	91,67	139	59,44	81	27,22	23	5,00
196	91,11	138	58,89	80	26,67	22	5,55
195	90,55	137	58,33	79	26,11	21	6,11
194	90,00	136	57,78	78	25,55	20	6,67
193	89,44	135	57,22	77	25,00	19	7,22
192	88,89	134	56,67	76	24,44	18	7,78
191	88,33	133	56,11	75	23,89	17	8,33
190	87,78	132	55,55	74	23,33	16	8,89
189	87,22	131	55,00	73	22,78	15	9,44
188	86,67	130	54,44	72	22,22	14	10,00
187	86,11	129	53,89	71	21,67	13	10,55
186	85,55	128	53,33	70	21,44	12	11,11
185	85,00	127	52,78	69	20,55	11	11,67
184	84,44	126	52,22	68	20,00	10	12,22
183	83,89	125	51,67	67	19,44	9	12,78
182	83,33	124	51,11	66	18,89	8	13,33
181	82,78	123	50,55	65	18,33	7	13,89
180	82,22	122	50,00	64	17,78	6	14,44
179	81,67	121	49,44	63	17,22	5	15,00
178	81,11	120	48,89	62	16,67	4	15,55
177	80,55	119	48,33	61	16,11	3	16,11
176	80,00	118	47,78	60	15,50	2	16,67
175	79,44	117	47,22	59	15,00	1	17,22
174	78,89	116	46,67	58	14,44	0	17,78
173	78,33	115	46,11	57	13,89	–1	18,33
172	77,78	114	45,55	56	13,33	2	18,89
171	77,22	113	45,00	55	12,78	3	19,44
170	76,67	112	44,44	54	12,22	4	20,00
169	76,11	111	43,89	53	11,67	5	20,55
168	75,55	110	43,33	52	11,11	6	21,11
167	75,00	109	42,78	51	10,55	7	21,67
166	74,44	108	42,22	50	10,00	8	22,22
165	73,89	107	41,67	49	9,44	9	22,78
164	73,33	106	41,11	48	8,89	10	23,33
163	72,78	105	40,55	47	8,33	11	23,89
162	72,22	104	40,00	46	7,78	12	24,44
161	71,67	103	39,44	45	7,22	13	25,00
160	71,11	102	38,89	44	6,67	14	25,55
159	70,55	101	38,33	43	6,11	15	26,11
158	70,00	100	37,78	42	5,55	16	26,67
157	69,44	99	37,22	41	5,00	17	27,22
156	68,89	98	36,67	40	4,44	18	27,78
155	68,33	97	36,11	39	3,89		

Por definición, 0 °C = 32 °F (= 273,15 K) y 100 °C = 212 °F (= 373,15 K).

Pues $0\,°F = \frac{9}{5}\ 0\,°C + 32$ y $0\,°F = \frac{9}{5}\ 0\,K - 459{,}67$.

Tabla XV. — NÚMERO DE GOTAS POR GRAMO DE ALGUNOS DE LOS REACTIVOS MÁS USUALES (Según Langeron, 1949)

Reactivos	Número de gotas por gramo	Reactivos	Número de gotas por gramo
Ácido acético cristalizado	56	Cloroformo	59
Alcohol absoluto	68	Agua destilada	20
— de 95°	64	Esencia de trementina	56
— de 90°	61	Éter sulfúrico	93
— de 80°	57	Percloruro de hierro	19
— de 70°	56	Ácido láctico	39
— de 60°	53	Piridina	41
Amoníaco	25	Ácido sulfúrico	26
Ácido nítrico	24	Tintura de yodo	61
Ácido clorhídrico	21	Salicilato de metilo	37

Debe señalarse que estas indicaciones no son exactas a no ser que se trabaje a 20 °C, y trabajando con un cuentagotas normal de Codex (diámetro exterior de 3 mm, diámetro interior 0,6 mm).

Tabla XVI. — DENSIDAD DE LOS ÁCIDOS

ÁCIDO CLORHÍDRICO

Densidad	% ClH (en peso)	ClH(g/l)	Normalidad	ml por 1 l, 1 N
1,1789	36	424,4	11,64	86
1,1837	37	438,0	12,01	83,3
1,1885	38	451,6	12,38	80,8
1,1932	39	465,4	12,75	78,4
1,1980	40	479,2	13,14	76,2

ÁCIDO NÍTRICO

Densidad	% NO_3H (en peso)	NO_3H(g/l)	Normalidad	ml por 1 l, 1 N
1,4048	68	955,3	15,16	66,0
1,4091	69	972,3	15,43	64,9
1,4134	70	989,4	15,70	63,8
1,4176	71	1006,0	15,96	62,7
1,4218	72	1024,0	16,25	61,6

ÁCIDO SULFÚRICO

Densidad	% SO_4H_2 (en peso)	SO_4H_2 (g/l)	Normalidad	ml por 1 l, 1 N
1,8337	95	1742	35,31	28,2
1,8355	96	1762	35,93	27,86
1,8364	97	1781	36,31	27,6
1,8461	98	1799	36,68	27,3

Tabla XVII. — TABLA DE PESOS ATÓMICOS (Según Tian y Roche, 1956)

Nombre del elemento	Símbolo	Pesos atómicos	Nombre del elemento	Símbolo	Pesos atómicos
Actinio	Ac	227	Mercurio	Hg	200,61
Aluminio	Al	26,97	Molibdeno	Mo	96,0
Antimonio	Sb	121,77	Neodine	Nd	144,27
Argón	A	39,94	Neón	Ne	20,2
Arsénico	As	74,96	Niobio	Nb	93,3
Azufre	S	32,064	Níquel	Ni	58,69
Bario	Ba	137,37	Nitrógeno	N	14,008
Berilio	Be	9,02	Oro	Au	197,2
Bismuto	Bi	209,00	Osmio	Os	190,8
Boro	B	10,82	Oxígeno	O	16,000
Bromo	Br	79,916	Paladio	Pd	106,7
Cadmio	Cd	112,41	Plata	Ag	107,88
Calcio	Ca	40,07	Platino	Pt	195,23
Carbono	C	12,000	Plomo	Pb	207,20
Cerio	Ce	140,13	Polonio	Po	210,0
Cesio	Cs	132,81	Potasio	K	39,096
Cloro	Cl	35,457	Praseodimio	Pr	140,92
Cobalto	Co	58,94	Radio	Ra	225,95
Cobre	Cu	63,57	Radón	Rn	222,0
Criptón	Kr	83,7	Rodio	Rh	102,91
Cromo	Cr	52,01	Rubidio	Rb	85,44
Disprosio	Dy	162,46	Rutenio	Ru	101,7
Erbio	Er	167,7	Samario	Sm	150,43
Escandio	Sc	45,10	Selenio	Se	79,2
Estaño	Sn	118,70	Silicio	Si	28,06
Estroncio	Sr	87,63	Sodio	Na	22,997
Europio	Eu	152,0	Talio	Tl	204,39
Flúor	F	19,00	Tántalo	Ta	181,4
Fósforo	P	31,027	Telurio	Te	127,5
Gadolinio	Gd	157,26	Terbio	Tb	159,2
Galio	Ga	69,72	Titanio	Ti	47,9
Germanio	Gc	72,60	Torio	Th	232,15
Hafnio	Hf	178,6	Tulio	Tu	169,4
Helio	He	4,00	Tungsteno	W	184,0
Hidrógeno	H	1,008	Uranio	Ur	238,14
Holmio	Ho	163,4	Uranio X_2	Ur X_2	234
Indio	In	114,8	Vanadio	V	50,96
Iridio	Ir	193,1	Xenón	X	130,2
Iterbio	Yb	173,6	Yodo	I	126,932
Itrio	Y	88,99	Zinc	Zn	65,38
Lantano	La	138,90	Zirconio	Zr	91,2
Litio	Li	6,94			
Lutecio	Lu	175,0			
Magnesio	Mg	24,32			
Manganeso	Mn	54,93			

Tabla XVIII. — SOLUCIONES ISOTÓNICAS

Son soluciones equilibradas con la concentración iónica del jugo celular.

Solución acuosa de cloruro sódico.
Se utiliza al 0,90 % para los animales de sangre caliente; al 0,80 % para las salamandras y al 0,64 % para las ranas.

Solución de Ringer:
Para anfibios:
ClNa: 0,65 g + ClK: 0,025 g + facultativamente CO_3HNa: 0,02 g y añadir por último Cl_2Ca: 0,03 g, todo ello en 100 ml de agua. El pH obtenido es próximo al 7,2. Para animales de sangre caliente: ClNa: 0,85 g + ClK: 0,025 g + Cl_2Ca: 0,03 g en agua destilada: 100 ml.

Solución de Ringer-Locke:
ClNa: 0,85 g + ClK: 0,042 g + CO_3HNa: 0,02 g + Cl_2Ca: 0,025 g en agua destilada: 100 ml, para animales de sangre fría reducir la cantidad de ClNa a 0,65 g.
Modificación de Lewis: añadir 0,01 a 0,25 g de dextrano.
Modificación de Bessis: añadir 3,5 g de polivinil pirolidona (subtosan).
Atención: todas las soluciones que contengan CO_3HNa deben estar esterilizadas por filtración sobre filtro de porcelana y evitar el calor, dado que éste disociaría esta sal.

Solución de tirode:
ClNa: 0,8 g + ClK: 0,02 g + Cl_2Ca: 0,02 g + Cl_2Mg: 0,01 g + PO_4H_2Na: 0,005 g + CO_3HN_a: 0,1 + glucosa 0,1 g en agua destilada: 100 ml; el pH es de 7,6, aproximadamente.

Solución de Knop:
Para tejidos vegetales: Cl_2Ca: 0,1 + ClK: 0,012 + SO_4Mg: 0,025 + PO_4H_2Na: 0,025 + trazas de Cl_3Fe + glucosa: 0,020 en 100 ml de agua destilada.

Solución de Fleisch:
Para poder esterilizar en caliente los líquidos de tirode pueden prepararse separadamente las dos soluciones siguientes y esterilizarlas:
A) ClNa: 8,0 g + ClK: 0,2 g + solución normal de CO_3Na_2: 20 ml + agua destilada: 500 ml.
B) Cl_2Ca: 0,2 g + Cl_2Mg: 0,1 g – solución de ClH normal: 8 ml + solución normal de PO_4H_3: 3,5 ml + glucosa: 1 g + agua destilada: 500 ml.
Mezclar en partes iguales las dos soluciones, en frío, en el momento de usar; pH: 7,52.

Solución tamponada de Baker para la conservación de espermatozoides:
Glucosa: 3 g + PO_4H_2Na, 12 H_2O: 0,6 g + ClNa: 0,2 g + PO_4H_2K: 0,01 g en 100 ml de agua destilada.

Agua de mar artificial:
En 1000 ml de agua destilada disolver: ClNa: 30 g + ClK: 0,8 g + SO_4Mg: 6,6 g + Cl_2Ca: 1,3 g + CO_3HNa: 0,5 g.

III. — REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

En materia de literatura científica, el interés de un texto es inversamente proporcional al logaritmo de su alejamiento en el pasado. Es por ello que un investigador empieza siempre a buscar sus referencias bibliográficas en las obras generales más recientes.

Las referencias que exponemos a continuación no constituyen un índice, que debería ser mucho más exhaustivo y contener varios millares de referencias, lo cual se alejaría de las proporciones de este Manual. Están destinadas principalmente a abrir vías de búsqueda bibliográfica y por ello están clasificadas, no por orden alfabético, sino por orden retrocronológico.

Únicamente hemos citado libros o colecciones de textos, figurando las últimas ediciones que hemos hallado.

Limitamos nuestras citas a los treinta y cinco últimos años.

1981-84

Colloque: Chitinozoaires et Paléomycologie, E.P.H.E., Paris, Juillet 1980; *Cahiers de Micropaléontologie,* C.N.R.S., Paris, 1981 (published 1982).

LOCQUIN M. V.: *Manual de Mycologie générale et Destructurale,* Masson, Paris, 1984.

LOCQUIN M. V.: *Les Champignons fossiles,* Paris, 1982.

1980

Second International Congress on Cell Biology; September 1980, W. Berlin: *European Journal of Cell Biology,* vol. 22, no. 1, 1980.

GOODFELLOW M. & BOARD R. G.: *Microbiological Classification and Identification,* Society for Applied Bacteriology, symposium series no. 8, 1980.

GOULD G. W. & CORRY J.E.L.: *Microbial Growth and Survival in Extremes of Environment,* Society for Aplied Bacteriology, technical series no. 15, Academic Press, London. 1980.

HAWKES P. W.: *Computer Processing of Electron Microscope Images,* Springer Verlag, Berlin, 1930.

KOWALEVSKY V. A.: *Image Pattern Recognition* (Translated from Russian by A. Brown), Springer Verlag, Berlin, 1980.

MAYER R. J. & WALKER J. H.: *Immunochemical Methods in the Biological Sciences — Enzymes and Proteins,* Academic Press, London, 1980.

MICHEL K.: *Die Grundzüge der Theorie des Mikroskops,* Wissenchaftliche Verlag, Stuttgart, 1980.

MORGAN B. L. & MCMULLAN D.: *Photo-Electronic Image Devices,* Academic Press, London, 1980.

ROLAND J.-C. & VIAN B.: *Atlas de Biologie Végétale, 1. Organisation des plantes sans fleurs,* Masson, Paris, 1980.

RUSKA E.: *The Early Development of Electron Lenses and Electron Microscopy* (Translated from German by Th. Mulvey), Hirzel Verlag, Stuttgart, 1980.

WEIBEL R.: *Stereological Methods,* vol. 1, *Practical Methods for Biological Morphometry,* Academic Press. New York & London, 1980.

1979

Fourth International Palynological Conference Proceedings, vol. I, Lucknow, India, 1979.

BERGAN T. & NORRIS J.R.: *Methods in Microbiology,* vols. 10-13. Academic Press, London, 1979-80.

GIEBISCH G., TOSTESON D. C. & USSING H.H.: *Membrane Transport in Biology,* vols. 1-4, Springer Verlag, Berlin, 1979.

PATTISON J. R., BITENSKY L. & CHAYEN J.: *Quantitative Cytochemistry and its Applications,* Academic Press. London. 1979.

RIDDLE P. N.: *Time Lapse Cinemicroscopy,* Academic Press, London, 1979.

ROBERTS K. & HYAMS J.S.: *Microtubules,* Academic Press, London, 1979.

ROSE A. H. & GARLTH MORRIS J.: *Advances in Microbial Physiology,* vols. 10 & 20, Academic Press, London, 1979-80.

SCHIMMEL G. & VOGELL. W.: *Methodensaminug der Elekctronmikroscopie,* 2 vols. Wissenschaltliche Verlag, Stuttgart, 1979.

SCHWEMMLER W.: *Mechanismen der Zellevolution,* W. de Gruyter, Berlin, 1979.

1978

AMELINCXX S., GEVERS R. & LANDUYT J. VAN (Eds.): *Diffraction and Imaging Techniques in Materials Science,* vol. I, *Electron Microscopy:* vol. II, *Imaging and Diffraction Techniques:* North-Holland, Amsterdam, 1978.

HALL, J. L.: *Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells,* Elsevier, Amsterdam, 1978.

HOPPE W., LOHMANN W., MAKKI. H. & ZIEGLER H. (Eds.): *Biophysic ein Lehrbuch. Korrigierten Nachdruck,* Springer Verlag, Berlin, 1978.

KOEHLER J. K.: *Advanced Techniques in Biological Electron Micrology II: Specific Ultrastructural Probes,* Springer Verlag, Berlin, 1978.
KOWALISKI P.: *Vision et mesure des couleurs,* Masson, Paris, 1978.
LOUTIT M. W. & MILES J. A. R.: *Microbial Ecology,* Springer Verlag, Berlin, 1978.
MAURICE F., MENYL L. & TIXIER R.: *Microanalyse et Microscopic Electronique à balayage,* Les éditions de Physique, Orsay, 1978.
MILES R. E.: *Geometrical Probability and Biological Structures: Beffon's 200th Anniversary,* Springer Verlag, Berlín, 1978.
SKINNER F. A. & SHEWAN J. M.: *Aquatic Microbiology,* Society for Applied Bacteriology; symposium series, 1978.

1977

ARBER W. & alt.: *Current topies in Microbiology and Immunology,* 76 vol. aparecidos en 1977; Springer, Berlin.
AUDREY M. GLAUERT: *Practical Methods in Electron Microscopy,* vol. 5, part I, N. Holland Publ. C°, Amsterdam, 1977.
BESSIS M.: *Réinterprétation des frottis sanguins,* Masson, Paris, 1977.
BRUX J. DE.: *Monographies d'histopathologie,* 8 son publicados en 1977, Masson, Paris.
CIBA FOUNDATION: *Symposia,* 51 vols. aparecidos en 1977, Elsevier, Amsterdam.
COFFEY S.: *Rodd's Chemistry of carbon,* 32 vols. aparecidos en 1977, Elsevier. Amsterdam.
CHANDLER, J. A.: *X-Ray Microanalysis in the electron Microscope,* vol. 5, part II, N. Holland Publ. C°, Amsterdam, 1977.
DROOP M. R. & JANNASCH H. W.: *Advances in aquatic Microbiology,* 1er. vol. aparecido en 1977; Academic Press, London.
FEBS: *Meetings,* 41 vols. aparecidos en 1977 Elsevier, Amsterdam.
FLORKIN M. & STOTZ E. H.: *Comprehensive biochemistry,* 31 vols. aparecidos en 1977, Elsevier, Amsterdam.
GRASSÉ P. P.: *Collection de Précis de Sciences Biologiques,* 12 vols. aparecidos en 1977, Masson, Paris.
GRASSÉ P. P.: *Précis de Zoologie,* 4 vols. aparecidos en 1977, Masson, Paris, 1977.
GRASSÉ P. P.: *Traité de Zoologie,* 35 vols. aparecidos en 1977, Masson, Paris, 1977.
GROSSER: *Die Hölzer Mitteleuropas,* Springer, Berlin, 1977.
GRUNDMANN E. & KIRSTEN W. H.: *Current Topics in Pathology,* 65 vols. aparecidos en 1977, Springer, Berlin.
HAQ B. U. & BOERSMA A.: *Introduction to marine Micropaleontology,* Elsevier, Amsterdam, 1977.
HOPPE W. & ALT.: *Biophysik,* Springer, Berlin, 1977.
LEWIS P. R. & KNIGHT D. P.: *Staining Methods for sectioned material,* N. Holland Publ. C°, Amsterdam, 1977.
LOCQUIN M. V.: *Flore mycologique,* 4 vols. aparecidos de 24: vol. III: Généralités, Guyot, Paris, 1977.
LUCOTTE G.: *Collection de Biologie Evolutive,* 3 vols. aparecidos en 1977, Masson, Paris.
MAILLET M.: *Abregé de cytologie,* 2.ª édit. Masson, Paris, 1977.
PAGES A. & MARTY-DOUBLE CH.: *Histophathologie endocrinienne,* Masson, Paris, 1977.
PILLER H.: *Microscope Photometry,* Springer, Berlin, 1977.
PIRSON A. & alt.: *Encyclopedia of plant physiology,* new serie, 26 vols. aparecidos en 1977, Springer, Berlin.
POIRIER J. & RIBADEAU DUMAS, J.-L.: *Atlas d'Histologie. Travaux pratiques,* Masson, Paris, 1977.
REIMER L. & PFEFFERKORN G.: *Raster Elektronenmikroskopie,* Springer, Berlin, 1977.
ROSE A. H. & TEMPEST D. W.: *Advances in Microbial Physiology,* 15 vols. aparecidos en 1977; Academic Press, London.
TEVINI M. & LICHTENTHALER H. K.: *Lipids and lipids polymers in higher plants,* Springer, Berlin, 1977.
WOLF G.: *Encyclopaedia Cinematographica,* Göttingen, 1977.

1976

BERNARD J.: *Actualités hématologiques,* 10 series aparecidos en 1976; Masson, Paris.
BETTON G.: *La Photomacrographie,* P.U.F., Paris, 1976.
COLLINS C. H. & LYNE P. M.: *Microbiological methods,* Butterworths, London, 1976, 4.ª ed.
COUPLAND R. E. & FUJITA T.: *Chromaffin, Enterochromaffin and related cells,* Elsevier, Amsterdam, 1976.
DELACRETAZ J. & alt.: *Atlas de mycologie médicale,* Masson, Paris, 1976.
FREY-WYSSLING, A.: *The Plant cell wall,* 3.ª ed., Stuttgart, 1976.
JAMES J.: *Light microscopic techniques in Biology and Medicine,* The Hague, 1976.
KESSEL R. G. & SHIH C. Y.: *Scanning electron Microscopy in Biology,* Springer, Berlin, 1976.
LEESON T. S. & C. R.: *Histologie,* Masson, Paris, 1976.
LEFEBVRE J.: *Initiation aux analyses statistiques multidimensionnelles,* Masson, Paris, 1976.
LEROUX-ROBERT J. & BRUX J. de: *Histopathologie O.R.L. et cervico-faciale,* Masson, Paris, 1976.
PILORGE J.: *Photomacrographie,* de Francia, Paris, 1976.
TEDESCHI H.: *Mitochondria,* Springer, Berlin, 1976.
TOMIYAMA K. I. & alt.: *Biochemistry and Cytology of plant parasite interactions,* Elsevier, Amsterdam, 1976.

1975

ALDERSON R. H.: *Design of the electron Microscope,* Elsevier, Amsterdam, 1975.
BETTON G.: *La Photographie scientifique,* P.U.F., Paris, 1975.

BRACHET J.: *Collection de Biologie Moléculaire,* 2 vols. aparecidos en 1975, Masson, Paris, 1975.
DURAND A.: *Photo-Ciné Macrographie,* Montel, 1976.
FOX C. F.: *Biochemistry of cell walls and membranes,* Butterworths London, 1975.
GLAUERT A.: *Practical Methods in Electron Microscopy,* 4 vols. aparecidos en 1975, Elsevier, Amsterdam.
GRASSÉ P. P.: *Collection: Les grands problèmes de la Biologie,* 12 vols. aparecidos en 1975, Masson, Paris.
KISS F. & SZENTÁGOTHAI J.: *Atlas d'Anatomie du corps humain,* 54.ª ed., 3.° en francés, III tomos, Masson, Paris, 1975.
LOCQUIN M. V.: *Guide des couleurs naturelles,* Sens, 1975.
MEIXNER A.: *Chemische Farbreaktionen von Pilzen,* Cramer, Lehre, 1975.
OLAH I & RÖHLICH P.: *Ultrastructure of lymphoid organs,* Masson, Paris, 1975.
PIETTE M. & C.: *Abrégé de cytologie et de physiologie hématologiques,* Masson, Paris, 1975.
RABIN H. & TANG C. L.: *Quantum Electronics,* Academic Press, New York, 1975.
SIEBURTH J. M.: *Microbial seascapes,* Baltimore, 1975.
STRAKA H.: *Pollen und Sporenkunde,* Stuttgart, 1975.
WALKER N.: *Soil Microbiology,* Butterworths, 1975.
WHALEY W. G.: *The Golgi apparatus,* Springer, Berlin, 1975.
WILD: *Micro Memo,* Heerbrugg, 1975.

1974

AGAR A. W. & alt.: *Principles and practice of Electron Microscope operation,* Elsevier, Amsterdam, 1974.
CLAUSEN J.: *Immunochemical techniques,* Elsevier, Amsterdam, 1969, 1974
CONSTANTINIDES P.: *Functional Electronic Histology,* Elsevier, Amsterdam, 1974.
DETERMANN H. & LEPUSCH F.: *Le Microscope et son utilisation,* Wetzlar, 1974.
DUHAMEL G.: *Histopathologie clinique de la moelle osseuse,* Masson, Paris, 1974.
FRANÇON M.: *Holography,* Academic Press, New York, 1974.
KESSEL R. G.: *Scanning electron Microscopy in Biology,* Berlin, 1974.
KODAK: *Photography through the Microscope* 6.ª ed., Rochester, 1974.
KODAK: *Filtres pour l'usage scientifique et technique,* Paris 1974.
LOISEAUX S. & alt.: *Atlas micrographique de cytologie végétale,* Masson, Paris, 1974.
MUNN E. A.: *The structure of mitochondria,* London, 1974.
OFFRET G. & DHERMY P.: *Anatomie pathologique de l'oeil et de ses annexes,* Masson, Paris, 1974.
PAUL J.: *Biochemistry of cell differentiation,* Butterworths London, 1974.
POIRIER J. & RIBADEAU DUMAS J.-L.: *Abrégé d'histologie,* Masson, Paris, 1974.
STERNBERGER L. A.: *Immunocytochemistry,* Prentice-Hall, N. J. 1974.
WISSE E, W. & alt.: *Electron Microscopy and Cytochemistry,* Elsevier, Amsterdam, 1974.

1973

BUCHER O.: *Diagnostic et diagnostic différentiel en cytologie et en histologie normales,* Masson, Paris, 1973.
FREY-WYSSLING A.: *Comparative organellography of the cytoplasm,* 1973.
HERVOUET F. & alt.: *Les structures oculaires au microscope à balayage,* Masson, Paris, 1973.
MALLET-GUY Y.: *Atlas de microscopie électronique du foie,* Masson, Paris, 1973.
MARKHAM R. & alt.: *The generation of subcellular structures,* Elsevier, Amsterdam, 1973.
MORICARD R. & alt.: *Cytopathologie utérine ultrastructurale,* Masson, Paris, 1973.
ROGERS A. W.: *Techniques of Autoradiography,* 2.ª ed., Elsevier, Amsterdam, 1973.
TONNELAT J.: *Biophysique,* II vol. 1968-1973, Masson, Paris.

1972

BESSIS M.: *Cellules du sang normal et pathologique,* Masson, Paris, 1972.
DEHOFF T. & RHINES F. N.: *Microscopie quantitative,* Masson, Paris, 1972.
FRANÇON M.: *Optique,* Masson, Paris, 1972.
IRIS L.: *Histopathologie oculaire,* Masson, Paris, 1972.
KODAK: *Applied infra Red Photography,* Rochester, 1972.
LE GRAND Y.: *Optique physiologique,* III vol., 1956-1972, Masson, Paris.
NEZELOF C. & alt.: *Techniques microscopiques,* Flammarion, Paris, 1972.
POLICARD A.: *La surface cellulaire et son microenvironnement,* Masson, Paris, 1972.

1971

BRUX J. DE: *Histophatologie gynécologique,* Masson, Paris, 1971.
ERÄNKO O.: *Histochemistry of nervous transmission,* Elsevier, Amsterdam, 1971.
HEYWOOD V. H.: *Scanning Electron Microscopy,* Academic Press, London, 1971.
LAMOTTE M.: *Initiation aux méthodes statistiques en biologie,* Masson, Paris, 1971.
TURNER W. B.: *Fungal métabolites,* Acad. Press, London, 1971.

1970

DOMMERGUES Y. & MANGENOT F.: *Écologie microbienne du sol.* Masson, Paris, 1970.
HEALEY P.: *Microscope et vie Microscopique,* Larousse, Paris, 1970.
LACHENAUD M.: *La précision instrumentale d'ordre scientifique,* Masson, Paris, 1970.
LARPENT J.-P.: *De la cellule à l'organisme,* Masson, Paris, 1970.
POLICARD A: *Cytologie moléculaire des membranes et compartiments de la cellule animale,* Masson, Paris, 1970.

1969

BETTON G.: *Photographie au Microscope,* Photo-R., Paris, 1969.
BEUGNIES A.: *Microscopie des milieux cristallins,* Dunod, Paris, 1969.
CONN H. J.: *Biological Stains,* 2.ª ed. rev. por R. D. Lillie, Williams & Wilkin, Baltimore, 1969.
DUHAMEL G.: *Histopathologie du ganglion lymphatique,* Masson, Paris, 1969.
FRANÇON M.: *Holographie,* Masson, Paris, 1969.
KODAK: *Photomacrography,* Rochester, 1969.
LAMBIN S. & GERMAN A.: *Précis de Microbiologie,* 2.ª ed., Masson, Paris, 1969.
LEVER W. F.: *Histopathologie de la peau,* trad. fr., Masson, Paris, 1969.
NOUGAREDE A.: *Précis de Biologie végétale, I. Cytologie,* Masson, Paris, 1969.
POULIQUEN Y.: *Atlas d'Histologie et d'Ultrastructure du globe oculaire,* Masson, Paris, 1969.
TURIAN G.: *La différenciation fongique,* Masson, Paris, 1969.
VUILLAUME M.: *Les pigments des invertébrés,* Masson, Paris, 1969.

1968

BOULLARD B.: *Les Mycorrhizes,* Masson, Paris, 1968.
CRETE P.: *Précis de Botanique,* 2 vol. aparecido en 1968, Masson, Paris.
DRAWERT H.: *Vitalfärbung und vitalfluorochromierung pflanzlicher Zellen und Gewebe,* Springer, Berlin, 1968.
GABE M.: *Techniques histologiques,* Masson, Paris, 1968.
POLICARD A. & BESSIS M.: *Eléments de pathologie cellulaire,* Masson, Paris, 1968.
SLADKOVA J.: *Interference of light,* Iliffe, London, 1968.

1967

BOURNE G. H. & DANIELLI J. F.: *International Review of Cytology,* (vol. 1-20). Academic Press; New York, 1952-1967.
BRUMPT E. & NEVEU-LEMAIRE M.: *Travaux pratiques de parasitologie,* 7.ª ed., Masson, Paris, 1967.
COLOVICK S. P. & KAPLAN N. O.: *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955-1967.
DAVIS J. B.: *Petroleum Microbiology,* Elsevier, Amsterdam, 1967.
GRAUMANN W. & NEUMANN K.: *Handbuch der Histochemie.* G. Fischer, Stuttgart, 1958-1967.
HUMASON G.: *Animal tissue techniques,* 2.ª ed., Freeman & Co., San Francisco, 1967.
LIPP W.: *Histochemische Methoden,* Oldenbourg., München, 1954-1967.
MARTOJA R. & MARTOJA-PIERSON M.: *Initiation aux techniques de l'histologie animale,* Masson, Paris, 1967.
OSTER G. & POLLISTER A. W.: *Physical techniques in biological Research,* 6 vols., Academic Press, New York, 1955-1967.
ROIG J.: *Optique physique,* Masson, Paris, 1967.

1966

BAKER J. R.: *Cytological technique,* 5.ª ed. Methuen & Cie., London, 1966.
COHU M.: *Sources lumineuses,* Masson, Paris, 1966.
JONES-MCCLUNG R.: *Basic microscopic technics,* The University of Chicago Press, 1966.
MAHONEY R.: *Laboratory techniques in Zoology,* Butterworth, London, 1966.
PIZON P.: *Photomacrographie et photomicrographie,* Masson, 1966.
PUNDEL J.-P.: *Précis de colpocytologie hormonale,* Masson, Paris, 1966.
SAADA G.: *Microscopie électronique des lames minces cristallines,* Masson, Paris, 1966.
SLATER C.: *Flavins and Flavoproteins,* Elsevier, Amsterdam, 1966.
STANIER R. Y. & alt.: *Précis de microbiologie générale,* Masson, Paris, 1966.
VANBREUSEGHEM R.: *Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire,* Masson, Paris, 1966.

1965

BARKA T. & ANDERSON P. S.: *Histochemistry,* Hoeber, New York, 1963: 2.ª reimpresión, 1965.
FRANÇON M. & SLANSKY S.: *Cohérence en Optique,* CNRS, Paris, 1965.
FREY-WYSSLING A. & MÜHLETHALER K.: *Ultrastructural plant Cytology,* Elsevier, Amsterdam, 1965.
HARMS H.: *Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie.* Staufen-Verlag, Kamp-Lintfort, 1965.
HERBEUVAL R. & H.: *Cellules cancéreuses et insolites du sang circulant,* Masson, Paris, 1965.

LILLIE R. D.: *Histopathologic Technic and practical Histochemistry*. 3.ª ed. McGraw-Hill, New York, 1965.
SATIR E. F. & HOVASSE R.: *Structure et fonction des cils et flagelles*, 1965.

1964

GRAY P.: *Handbook of basic Microtechnique*, The Blakiston Co., New York, 1952; 2.ª edición 1964.
POLICARD A.: *Cellules vivants et populations cellulaires*, Masson, Paris, 1964.
SALTON M. R. J.: *The Bacterial cell wall*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
SCANGA F.: *Atlas of Electron Microscopy*, Elsevier, Amsterdam, 1964.
STOCKINGER L.: *Vitalfärbung und Vitalfluorochromierung tierischer Zellen*, Springer, Berlin, 1964.
TITLBACH M.: *Electron Microscopy*, 2 vols., Prague, 1964.

1963

ARVY L.: *Histo-enzymologie des glandes endocrines*, Gauthier-Villars, Paris, 1963.
«COLOUR INDEX»: 2.ª edición, Society of Dyers and Colourists, Bradford, Yorkshire & American Association of Textile Chemists and Colorists, Lowell, Mass., 1956-suplemento, 1963.
CULLING C. F. A.: *Handbook of histopathological technique*, 2.ª edición. Butterworth, London.
VAZART B.: *Différenciation des cellules sexuelles et fécondation chez les Phanérogames 1958 et les Cryptogames*, 1963.
VERNE J.: *Précis d'histologie*, Masson, Paris, 1963.

1962

BREESE JR, S. S.: *Electron Microscopy*, 2 vols. Academic Pr. London, 1962.
BURSTONE M. S.: *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*, Academic Press, New York, 1962.
CLAYDEN E. C.: *Practical section cutting and staining*, 4.ª edición, Churchill, London, 1962.
GURR E.: *Staining animal tissues*, Hill, London, 1962.
HARRIS R. J. C.: *The Interpretation of Ultrastructure*, Academic Press. New York, 1962.
JOHNSTONE M. C.: *Applications and methods of couting and sizing in medicine and biology*. New York, 1962.

1961

CLARK G. L.: *Encyclopedia of Microscopy*, 1961.
CONN H. J.: *Biological stains*, 7.ª edición, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1961.
DANIELLI J. F.: *General cytochemical methods*, Academic Press, New York, 1958, 1961.
MAGNAN CL.: *Traité de Microscopie Electronique*, 2 vols., Hermann, Paris, 1961.

1960

BESSIS M.: *Ultrastructure de la cellule*, Sandoz, 1960.
CONN H. J. DARROW M. H. & EMMEL V. M.: *Staining procedures used by the Biological Stain Commission*, 2.ª edición, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1960.
DAVENPORT H. A.: *Histological and histochemical technics*, Saunders, Philadelphia, 1960.
GURR E.: *Encyclopaedia of microscopic Stains*, Hill, London, 1960.
ENGSTRÖM A. & alt.: *X-ray Microscopy and X-ray Microanalysis*, Elsevier, Amsterdam, 1960.
LISON L.: *Histochimie et cytochimie animales*, 3.ª edición. Gauthier-Villars, Paris, 1960.
MARECHAL A. & FRANÇON M.: *Diffraction*, Ed. Revue d'Optique, Paris, 1960.
MCMANUS J. A. F. & MOWRY R. W.: *Staining methods, histological and histochemical*, Hoeber, New York, 1960.
MELLORS R. C.: *Analytical Cytology*, 2.ª edición. McGrave Hill Book Co., New York, 1960.
PANTIN C. F. A.: *Notes on microscopical technique for Zoologists*, Cambridge University Press, Cambridge, 1960.
PEARSE A. G. E.: *Histochemistry*, 2.ª edición, Churchill, London, 1960.
PEASE D. C.: *Histological Techniques for Electron Microscopy*, Academic Press., New York, 1960.
PERELLI: *Microfotografia e macrofotografia*, Progresso fotografico ed. Milano, 1960.
SCHULZE E. & GRAUPNER H.: *Anleitung zum mikroskopisch-technischen Arbeiten in Biologie und Medizin*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1960.
STEEDMAN H. F.: *Section cutting in Microscopy*, Blackwell, Oxford, 1960.

1959

BORN M. & WOLF E.: *Principles of Optics*, Pergamon, London, 1959.
CASSELMAN W. G. B.: *Histochemical technique*, Methuen Cie., London, 1959.
GAUTHERET R.-J.: *La culture des tissus végétaux*, Masson, Paris, 1959.
HAITINGER M., EISENBRAND J. & WERTH G.: *Fluoreszenzmikroskopie*, Akademische Verlagsgesselschaft, Leipzig, 1959.
HAUG, H.: *Leifaden der mikroskopischen Technik*, G. Thieme, Stuttgart, 1959.

1958

ALLEN R. M.: *Photomicrography,* 2.ª edición, 1958.
DANGEARD P. & PERNER E. S.: *Le chondriome de la cellule végétale,* 1958.

1957

ARVY L.: *Les techniques actuelles d'Histo-enzymologie,* Biologie médicale, 1957-1958.
BAKER J. R.: *Principles of biological Microtechnique,* Methuen, Lohdon, 1957.
CHAMOT E. & MASON C.: *Handbook of chemical Microscopy,* Chapman, London, 1958.
CIVATTE A.: *Atlas d'histopathologie cutanée,* Masson, Paris, 1957.
FREUND H.: *Handbuch der Mikroskopie in der Technik,* Frankfurt, 1957.
GASTINEL P.: *Précis de bactériologie médicale,* Masson, 2.ª edición, Paris, 1957.
GURR E.: *Methods of analytical Histology and Histochemistry,* Hill, London, 1958.
HERVOUET F.: *Travaux d'Anatomie pathologique oculaire,* IV series, 1958 a 1968, Masson, Paris.
LAU E. & KRUG W.: *Die Aquidensitometrie,* Akademie Ver., Berlin, 1957.
LEROUX R.: *Pratique anatomopathologique, Microscopie,* 2.ª edición, Masson, Paris, 1957.
MARTIN L. C. & JOHNSON B. K.: *Practical Microscopy,* Blackie, London, 1957.
MC CRONE JR W. C.: *Fusion methods in chemical Microscopy,* Interscience, New York, 1957.
POLICARD A., BESIS M. & LOCQUIN M.: *Traité de Microscopie,* Masson, Paris 1957.
PREVOT A.-R.: *Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies,* 3.ª edición, Masson, Paris, 1957.
STOVES J. L.: *Fibre Microscopy,* National T. P., London, 1957.

1956

BORDET P.: *Précis d'optique cristalline appliquée á l'identification des minéraux,* Masson, Paris, 1956.
DANGEARD P. & alt.: *Le vacuome de la cellule vegétale,* Lechevalier, Paris, 1956.
KELLY J. W.: *The Metachromatic reaction,* Springer, Berlin, 1956.
LOCQUIN M. V.: *Chromotaxia,* Paris, 1956.
SJÖSTRAND F. S. & RHODIN J.: *Electron Microscopy,* Almquist, Stockholm, 1956.
VICHERS A. E. J.: *Modern methods of Microscopy,* Butterworth, London, 1956.

1955

APPELT H.: *Einführung in die mikroskopischen Untersuchungsmethoden,* Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig, 1955.
COUDERT J.: *Guide pratique de mycologie médicale,* Masson, Paris, 1955.
ERÄNKO O.: *Quantitative methods in histology and Microscopic Histochemistry,* Karger, Basel, 1955.
FREY-WYSSLING A.: *Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas,* Springer, Berlin, 1955.
GRIVET, P.: *Traité d'optique électronique,* t. I. BORDAS, Paris, 1955.
HERMANSEN A.: *A theory of interference filters*, Copenhagen, 1955.
VAUCOULEURS G. & alt.: *Manuel de Photographie scientifique,* Masson, Paris, 1955.

1954

BERTRAND L. & ROUBAULT M.: *L'emploi du Microscope Polarisant,* Lamarre, Paris, 1954.
BESSIS M.: *Traité de Cytologie sanguine,* Masson, Paris, 1954.
DAYRE J. & CASSAN M.: *Guide graphique pour la conversion des unités,* Eyrolles, Paris, 1954.
DUPOUY G.: *Le microscope électronique,* Collection Que Sais-je? P.U.F. 1954.
FRANÇON M.: *Le Microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel,* CNRS, Paris, 1954.
FRISON ED.: *L'évolution de la partie optique du Microscope au cours du 19.ᵉ siècle,* Leyde, 1954.
GRAY, P.: *The microtomist formulary and guide,* Blakiston, New York, 1954.
LE POOLE J. B.: *Some designs electron and ion optics,* Delft, 1954.
LILLIE R. D.: *Histopathologic technic and practical Histochemistry,* Blakiston, New York, 1954.
PAYNE B. O.: *Microscope design and construction,* York, 1954.
SEGUY E.: *Initiation à la Microscopie,* Boubée, Paris, 1954.

1953

BARER R.: *Lecture notes on the use of the Microscope,* Blackwell, Oxford, 1953.
HALL, C. E.: *Introduction to electron microscopy.* McGraw-Hill, New York, 1953.
HALLIMOND A. F.: *The Polarizing Microscope,* 2.ª edición, Nueva York, 1953.
HAUDUROY P.: *Dictionnaire des bactéries pathogènes,* 2.ª edición, Masson, Paris, 1953.
HEUNERT H.-H.: *Praxis der Mikrophotography,* Springer, Berlin, 1953.
LOCQUIN M. V.: *Compte rendus du premier congrès international de Microscopie électronique,* Ed. Rev. d'Optique, Paris, 1953.
MARSHALL C. E.: *Crystal Optics,* York, 1953.

SCHAEFFER H. F.: *Microscopy for Chemists*, 2.ª edición, Van Nostrand, Princeton, 1953.
VIALLI M.: *Introduzione alla Ricerca Istochimica*, Industria Poligrafica Lombarda, Milano, 1953.

1952

AGASSE-LAFONT E.: *Le Laboratoire*, 2 vols. Vigot, 1952.
GOMORI G.: *Microscopic Histochemistry*, The university of Chicago, Press, Chicago, 1952.
KOHLER L. R.: *Ultraviolet radiation*, Chapman, London, 1952.
KRAJIAN A. A. & GRADWOHL R. B. H.: *Histopathological technic*, 2.ª edición, The C. V. Mosby Co., St Louis, 1952.
LANGERON M. & VANBREUSEGHEM R.: *Précis de Mycologie*, 2.ª edición, Masson, Paris, 1952.

1951

BENNETT A. H. & alt.: *Phase Microscopy*, Chapman, London, 1951.
BLOTTIAU F.: *Colorimétrie in Encyclopédie photométrique*, Masson, Paris, 1951.
COSSLETT V. E.: *Practical Electron Microscopy*, 1951.
HAUDUROY P.: *Techniques bactériologiques*, Masson, Paris, 1951.
HUND, F.: *Einführung i.d. theoret. Physics*, 2.ª edición, bd., III *Optik*, Lepzig, 1951.
JAULMES CH. & alt.: *Pratique du laboratoire*, Masson, Paris, 1951.
TERRIEN J.: *De la loupe au Microscope électronique*, P.U.F., Paris, 1951.

1950

BAKER J. R.: *Cytological technique*, 3.ª edición, London, Methuen, 1950.
DRUMMOND D. G.: *The practice of electron microscopy*. Ex. journ. Roy. Micr. Soc. Série 3,70. 1-141, London, 1950.
FRANÇON M.: *Le Contraste de phase en Optique et en Microscopie*, Rev. Opt., Paris, 1950.
GATENBY J. B. & BEAMS H. W.: *Bolles Lee's «The Microtomist's Vade Mecum»*, McGraw-Hill Book Co., New York, 1950.
GREGOIRE CH.: *Microscope électronique et recherche biologique*, Masson, Paris, 1950.
JONES-MCCLUNG R.: *McClungs Handbook or Microscopical technique*, Hoeber, New York, 1950.
UBER F. M.: *Biophysical research Methods*, Interscience, New York, 1950.
WISE F. C. & alt.: *The binocular Microscope*, London, 1950.

1949

BORRIES, VON B.: *Die Uebermikroskopie*, Cantor, edicion, Aulendorf, 1949.
CARLIN B.: *Ultrasonics*, McGraw Hill, New York, 1949.
FLOSDORF E. W.: *Freeze-Drying*, Reinhold, New York, 1949.
GLICK D.: *Techniques of Histo- and Cytochemistry*, Interscience, 1949.
LANGERON M.: *Précis de Microscopie*, 7.ª edición, Masson, Paris, 1949.
RICHARDS O. W.: *The effective use and proper care of the Microscope*, Buffalo, 1949.
SEGUY E.: *Le microscope et ses applications*, 2 vols., Paris, Lechevalier 1942-1949.
WYCKOFF R. W. G.: *Electron Micrography: Technique and Application*, Interscience, New York, 1949.
YATES F.: *Sampling Methods for Censures and Surveys*, Charles Griffin & Co., London 1949.

1948

BOURNE H. K.: *Discharge lamps for Photography and Projection*, Chapman, London, 1948.
CLERC L.-P.: *La technique photographique*, 4.ª edición, Montel, Paris, 1948.
COLAS G.: *Guide de l'entomologiste*, Boubée, Paris, 1948.
COWDRY E. V.: *Microscopic technique in Biology and Medicine*, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1948.
FONBRUNE P. DE: *Le Micromanipulateur pneumatique et la Microforge*, Beaudouin, Paris, 1948.
KÖFLER L. et alt.: *Mikromethoden zur Kennzeichnung organischer Stoffe und Stoffgenische*, Wagner, Innsbruck, 1948.
LOCQUIN M. V. & J. DRAGESCO: *Les premiers stades du développement des Myxomycètes*, 1948, film 16 mm.
ROMEIS B.: *Mikroskopische Technik*, Oldenbourg. München, 1948.
ROULET F.: *Methoden der pathologischen Histologie*, Springer, Wien, 1948.
TODD J. C. & SANFORD A. H.: *Clinical diagnosis by laboratory methods*, 11.ª edición, Saunders, 1948.

IV. — ÍNDICE ALFABÉTICO

En este índice se encontrarán los nombres de los compuestos, de los órganos y orgánulos, de instrumentos, de técnicas, de reactivos y de autores, ordenados alfabéticamente. No se encontrarán los autores citados en el índice bibliográfico, ni los sinónimos de los colorantes que figuran en las pp. 194 y 231, ni tampoco las palabras citadas en el vocabulario técnico de la p. 330.

Abbe, 7
Aberración esférica, 7
Aberraciones, 116
Abertura numérica, 8, 9
Ablandamiento, 131
Absorción, 5, 24, 28, 114, 349
Aceite, 24, 266
Aceite de acacia, 177, 348
Aceite de almendras, 348
Aceite de anilina, 147, 176, 178
Aceite de anís, 348
Aceite de bergamota, 177, 348
Aceite de canela, 348
Aceite de Castor, 348
Aceite de Cayaput, 348
Aceite de cedro, 177, 348
Aceite de grano de Pavot, 177
Aceite de inmersión, 348
Aceite de limón, 348
Aceite de lino, 348
Aceite de madera de sándalo, 348
Aceite de oliva, 348
Aceite de orégano, 348
Aceite de parafina pura, 175, 348
Aceite de ricino, 177
Aceite de tomillo, 348
Acetal fosfatido, 234
Acetato de Na, 347
Acético, 227
Acetil Sudán IV, 184, 194
Acetilación reversible, 236
Acetólisis, 259
Acetona, 146, 147, 348
Ácido acético, 124, 347, 348
Ácido ascórbico, *cf.* Vitamina C
Ácido azobencénico fenilhidracina sulfónica, 230
Ácido bórico, 347
Ácido bromídrico, 262
Ácido carmínico, 192, 199
Ácido cítrico, 347
Ácido cloranílico, 199
Ácido clorhídrico, 346, 347, 352
Ácido clórico, 132
Ácido crómico, *cf.* Trióxido de cromo
Ácido etilen diamino tetraacético, 202, 211, 212
Ácido fórmico, 347
Ácido fosfomolíbdico, 251, 262, 277
Ácido fosfotúngstico, 251, 277
Ácido isopicrámico, 205
Ácido maleico, 347
Ácido nítrico, 262
Ácido nucleico, 237
Ácido ósmico, *cf.* Tetraóxido de osmio
Ácido oxálico, 347
Ácido pararrosólico, 209
Ácido peracético, 132, 324
Ácido perfórmico, 132, 324
Ácido periódico-Schiff, 236
Ácido pícrico, 121, 186, 209, 212
Ácido pícrico-verde luz, 322
Ácido pirogálico, 305
Ácido ribonucleico, 188, 237
Ácido rosólico, 196, 211
Ácido rubeánico, 201
Ácido rufiánico, 205, 210, 211
Ácido sulfúrico, 352
Ácido-alcohol-resistente, 250
Acidofilia, 228, 245
Acidorresistencia, 250, 267, 272
Aclaramiento, 131
Acomodación, 24
Acridina, 229
Acriflavina, 203, 204, 212
Actinomicetos, 309
Addicott, 261
Adsorción, 219
Adyama, 128
Afilado, 159
Afilado automático, 160
Agua albuminosa, 170
Agua destilada, 348
Agua fisiológica, 140
Agua oxigenada, 132
Agua sulfurosa, 234
Agua de Javel, *cf.* Hipoclorito
Agua de mar, 348
Agua de mar artificial, 354
Airy, 9
Aislamiento, 134
Albúmina, 348
Albúmina glicerinada, 170
Albúmina mercurial, 174
Alcalina, 196, 260, 267, 268
Álcalis, 117
Alcaloides, 266
Alcanfor, 119
Alcohol amílico, 146
Alcohol butílico, 146, 348
Alcohol etílico, *cf.* Etanol
Alcohol isopropílico, 146, 348
Alcohol polivinílico, 148, 175, 176, 348
Aldehídos, 229, 230, 236
Aleurona, 262
Alfa naftilamina, 186, 196
Alfa naftol, 208
Alfa naftol benceína, 207
Alfazurina, 196, 209
Alginatos, 297
Algodón hidrófilo, 301
Alizarina, 182, 195
Almidón, 238, 252, 263
Alteración de portaobjetos, 174
Altmann, 125, 128, 322
Aluminio, 224
Allen, 119, 125
Amann, 118, 261
Amaranta, 198, 212
Amarillo alcián, 187, 195
Amarillo brillante, 198, 209
Amarillo brillante antiguo, 200
Amarillo brillante sulfurin, 183, 198, 214
Amarillo cromo, 200
Amarillo intenso, 195, 204
Amarillo Janus, 205
Amarillo liposoluble, 183, 199, 204, 209, 211
Amarillo liposoluble azulado, 209
Amarillo naftol sulfonado, 186, 207
Amarillo naftol sulfurin, 204
Amarillo sólido, 187, 205, 213
Amarillo Sudán amarillento, 211
Amarillo de acridina, 193, 195, 230
Amarillo de alizarina amarillento, 195, 206, 207, 211
Amarillo de alizarina rojizo, 195, 196, 207, 209
Amarillo de anilina, 196, 204, 209, 211
Amarillo de diamina intenso, 200, 201
Amarillo de Mars, 186, 205, 206
Amarillo de metanilo, 183, 195, 206, 209
Amarillo de nitrazol, 200, 208
Amarillo de quinolina A, 210
Amarillo de quinolina H, 210
Amarillo de quinolina rosado, 210
Amarillo de quinolina sulfurin, 210
Amarillo de tiazol, 191, 194, 200, 213
Amebas, 274
Amido-negro muy azul, 196, 199, 210
Amiloide, 184, 187, 189, 191, 238, 245, 252
Aminas, 231
Aminofilia, 235
Amoníaco, 117, 347
Amonio, 226
Ampollas, 4, 17
Anaplasmas, 286
Anderson, 146
Andrés, 119
Anestesia bajo cubreobjetos, 299
Ángulo de ataque, 160
Anillo de Ranvier, 133
Aniones, 226-228
Anisotropia biológica, 50
Anoptral, 41
Antiformina, 117
Antimonio, 191
Antirreflectante, 10
Antocianos, 266
Antracogramo, 100
Antrapurpurina, 196

Antrapurpurina ácida, 194
Antraquinonas, 182
Aoyama, 125
Aparato de Golgi, 183, 190, 320
Apathy, 126, 154, 176, 179, 220, 221, 259
Apotecios, 313
APS, *cf.* Ácido periódico de Schiff
APS-Azul alcián, 252
Araldita, 153
Argentafin, 230, 253
Arsénico, 224, 226
Artrosporas, 310
Arvy, 223
Ascospora, 314
Asfixia, 119
Ashburn, 232
Astracianina, 196
Astracianina B, 196
Atebrina, 191, 193, 196, 206
Aubry, 105
Aumento útil, 9
Auramina, 196, 198, 230
Auramina amarillenta, 196
Aurantia, 186, 196, 201, 205
Aurina, 214
Automatización, 82, 316
Automatización de tinciones, 222, 316
Autorradiografía, 99
Azafrán, 206, 211-214
Azán de Heidenhain, 182
Azocarmín amarillento, 182, 196, 210, 211
Azocarmín azulado, 182, 196
Azocarmín-anilina, 243
Azofucsina, 196
Azofucsina amarillenta, 196
Azofucsina azulada, 196
Azofucsina sulfurina, 196
Azofucsina-anilina, 196
Azoicos, 183
Azophloxina, 211
Azorreacción, 230
Azufre, 348
Azul Astra, 187
Azul Azo, 184, 196, 202
Azul acetona, 206
Azul ácido intenso rojizo, 203, 212
Azul ácido sulfonado rojizo, 195, 197, 201, 203, 204, 211
Azul ácido de alizarina, 194
Azul alcalino, 196
Azul alcián, 187, 196
Azul azo ácido, 211
Azul BASF, 211
Azul BZL, 182, 197
Azul brillante metacromático azulado, 201, 206
Azul Calco, 262
Azul Capri, 199
Azul Capri metilado, 199
Azul celeste, 191
Azul celeste benzo, 197, 208, 210, 211
Azul celestina, 199, 200
Azul cetona, 206
Azul cobalto, 199, 200, 211
Azul Congo brillante azulado, 198
Azul cromoxano, 198, 200, 210
Azul Chicago, 184, 199
Azul Chicago muy azul, 197, 198, 208
Azul Chicago rojizo, 197, 199
Azul diamin azulado, 197
Azul diamin rojizo, 184, 201
Azul dianil azulado, 198, 202, 207
Azul Evans, 184, 203
Azul fenicado, 313
Azul gallamina, 187, 204
Azul Gallo, 204, 209
Azul indazol, 205
Azul indazol rojizo, 205
Azul intenso azulado, 185, 201, 203, 207, 231
Azul intenso azul-violáceo, 197, 203, 207, 212, 231
Azul intenso rojizo, 197, 201, 203, 231
Azul isamina, 195, 198, 202, 206, 210
Azul liposoluble, 182, 209
Azul Luxol, 187
Azul Luxol intenso, 196
Azul Luxol sólido, 198
Azul mordiente intenso, 202
Azul Nación intenso, 208
Azul negro B, 185
Azul negro naftol, 185, 209
Azul Neptuno, 198, 208, 210
Azul nitrogenado de tetrazolio, 186, 209
Azul noche, 190, 208
Azul nuevo rojizo, 187
Azul oscuro intenso amarillento, 231
Azul oscuro intenso rojizo, 203, 208
Azul oscuro rojizo, 198
Azul patente, 177, 195, 196, 198, 210, 214
Azul Sirius amarillento, 211, 212
Azul Sudán, 211
Azul Sudán amarillento, 211
Azul sulfonado ácido rojizo, 195
Azul Thedan, 281, 294
Azul tetrazolio, 197, 199
Azul tripán, 184, 197, 199, 201, 208, 212
Azul ultramar, 192, 212
Azul Victoria azulado, 190, 200, 204
Azul Victoria muy rojo, 190, 203, 204
Azul Victoria rojizo, 190, 200, 208
Azul de alizarina, 195
Azul de alizarina ácido, 195
Azul de anilina, 189, 196-198, 200, 206, 211, 214, 247, 349
Azul de antraceno, 182, 196
Azul de antracianina, 196
Azul de antrazanina, 182
Azul de benzo, 197
Azul de benzo azulado, 202, 212
Azul de cresil amoniaco-acético, 272
Azul de cresil brillante, 187, 197, 198, 200, 230
Azul de ditolifenilmetano, 199
Azul de Herxheimer, 205
Azul de Lyon, 189, 196, 198, 204
Azul de Meldola, 198
Azul de metileno, 188, 198, 207, 212, 230, 248, 268, 349
Azul de metileno-rojo de rutenio, 259
Azul de metilo, 189, 198, 200, 267, 268
Azul de metilo acético, 270
Azul de metilo-lactofenol, 270
Azul de metilo-Sudán-lactofenol, 270
Azul de molibdeno, 191, 260, 265
Azul de Nilo, 187, 208, 233, 314, 340
Azul de Nilo azulado, 208
Azul de Prusia, 191, 197, 199, 207, 210, 223, 262
Azul de quinolina, 185, 200, 210
Azul de Suter-Geigy, 294
Azul de tionina, 197, 207, 208
Azul de toluidina, 188, 207, 212, 230, 349
Azul de toluidina-aurantia, 322
Azul de toluidina-verde de metilo, 250
Azul de toluileno, 212
Azul de Turnbull, 191, 212, 255
Azul de xilenol, 214
Azur de metileno, 188, 197, 207

Babinet, 41
Bacilo diftérico, 250
Backstron, 114
Bacterias, 182, 184, 188-191, 245, 251
Bacterias del suelo, 191
Bajo al aceite O, 185
Baker, 124, 129, 353
Bálsamo de camsal, 177
Bálsamo de Tolu, 305, 348
Bálsamo del Canadá, 26, 47, 177, 178
Balzers, 110
Bandas de absorción de colorantes, 348
Barbier, Bérnard, y Turenne, *cf.* B. B. T.
Barer, 50
Barera, 233
Barger, 112
Bario, 224
Barniz, 178
Barrnett, 234
Basofilia, 229, 237, 245, 246
Baud, 50, 145
Bauer, 263
B.B.T., 14, 43, 48, 56
Beams, 113
Benceno, 149, 348
Bencidina, 230, 254
Benda, 123, 126, 127, 243
Benoit, 128
Bensley, 126, 128, 220, 262
Benzoato de metilo, 147, 348
Benzoazurina, 267
Benzoflavina, 193, 197, 204
Benzopurpurina, 184, 197
Benzopurpurina muy azul, 197, 200, 201
Berberina, 192, 197
Berek, 283, 294, 302, 306-308
Berilio, 224
Berthsen, 219
Bertrand, 32
Bessis, 82, 83, 108, 156
Best, 263
Beta caroteno, *cf.* Vitamina A
Betún de Judea, 179
Biácido de Mann, 270
Bicarbonato, 227
Bicarbonato de K, *cf.* Dicromato de K
Bifocal, 32
Bignardi, 236
Bilirrubina, 255
Binocular, 22
Binson, 229
Biondi, 245
Biopsia, 308, 324
Bióxido de cloro, 132
Birrefringencia, 46, 47, 255
Bismutato de Na, 252
Bismuto, 224

Biuret, 262
Blackberg, 237
Blaisse, 41
Blanco, 4
Blanchard, 122
Blastosporas, 311
Bloques, 109
Bloques de parafina, 149
Blum, 122
Bockmühl, 15
Bodian, 253
Boidin, 271
Borato de Na, 347
Bordeaux intenso, 185, 198, 203, 231
Bordeaux rojizo, 183, 196, 198
Bordeaux de Hesse, 205
Borrel, 146
Bouin, 125
Boyle, 121
Brace, 41
Brasil, 126
Brasilina, 192
Braudet, 174
Bricka, 110
Brillo, 3
Brillo espectral, 16
Bromo, 132, 233, 267
Bromobenceno, 348
Bromonaftaleno, 348
Bromuro, 226
Bromuro de yodo, 132
Brumpt, 284
Bryan, 220
Bugnon, 260
Buller, 112
Burbuja de aceite, 25
Burbuja de aire, 25, 26
Burdon, 265
Bürker, 93
Burri, 307
Burstone, 141

Cabellos y pelos, 315
Cadmio, 225
Cadmioformolado, 128
Cafeína, 266
Caín, 233, 234
Caja de inclusiones, 150
Calcificación, 247
Calcio, 182, 186, 224, 242, 245, 266
Calcita, 41
Callosa, 260, 264, 267, 268, 270
Cámara de contaje, 93
Cámara de Legendre, 283
Cámara de televisión, 55
Cámaras de cultivo, 137, 138
Cambio de líquido, 117
Caméca, 101
Campo, 4
Campo oscuro artificial, 311
Capilaridad, 117
Cápsulas, 311
Cápsulas bacterianas, 184, 186, 189, 250
Cápsulas de gelatina, 299
Caracterización de los elementos membranosos, 264
Carasso, 107
Carbón, 254
Carbonato, 227
Carbonato de plata, 249
Carbowax, *cf.* Polietilen glicol
Carcinología, 234
Carey, 248
Cariotipo, 321
Carmalumbre, 235
Carmín, 192, 199, 300, 349
Carmín acético, 299
Carmín alumínico, 259, 267, 300
Carmín alumínico-Cyanol, 235
Carmín borácico, 290
Carmín propiónico, 271
Carmín-verde de yodo, 259
Carnoy, 126, 323
Caroteno, 266
Carotenoides, 234, 253
Carotiprótidos, 253
Cartílago, 188, 245, 246
Castañeda, 286
Castelain, 324
Cationes, 224, 227
Causas de error, 21
Cedax, 348
Celofana, 305, 349
Celoidina, 148
Célula cancerosa, 183, 184, 187, 189, 191
Célula ganglionar, 248
Célula neurosecretora, 249
Celulosa, 184, 189, 191, 252
Cellosolve, 146, 147
Cementado, 178
Cemento de Apathy, 179
Cendrier, 117
Centrifugación química, 294
Centrosoma, 323
Cerceau-Larrival, 258
Cerebrósidos, *cf.* Glucolípidos
Ceruleína sulfúrica, 200
Cesio, 225
Cetilpiridina, 265
Cetonización de carboxilos, 234
Ciánico, 227
Cianina de alizarina, 194, 195
Cianina de cromo, 199, 211
Cianochina, 299
Cianofilia, 229, 237
Cianol, 189, 201, 214, 235, 255
Cianuro, 191, 226
Cinemicrografía, 72
Citocromo, 256
Citodiagnóstico carcinológico, 324
Citofijador RAL, 324
Citología, 127, 259, 320
Citoplasma, 243, 245, 246, 250
Citrato de Na, 347
Clamidospora, 184
Clara de huevo, 297
Clarite, 348
Clarke, 121, 124, 126
Cloraclorofenol, 117, 175
Cloral, 117, 174, 348
Cloral gelatinado, 176
Cloral-fenol, 117, 132
Cloral-lactofenol, 117, 175, 232, 315, 316
Clórico, 226
Cloro, 132
Cloroformo, 119, 147, 348
Cloroplato-osmio-acético, 125
Cloruro, 226
Cloruro férrico, 347
Cloruro mercúrico, 122
Cloruro de Ca, 175, 348
Cloruro de Cd, 348
Cloruro de K, 347
Cloruro de Na, 347
Cloruro de oro, 23
Cloruro de trifeniltetrazolium, 212
Cloruro de yodo, 38
Cloruro de Zn yodado, 263
Coagulante-colorante, 261
Cobalto, 191, 225
Cobaltoformol, 128
Cobre, 225, 265
Cocaína, 119
Coccidios, 288
Cochinilla, 192, 20
Códigos de colores, 5
Colágena, 243, 246, 251, 270
Coles, 302
Colodión, *cf.* Celoidina
Colodión lactoricinado, 270
Color, 2, 4, 61-64
Color Index, 182, 194
Coloración, 213
Coloraciones bacteriológicas, 249
Coloraciones citológicas, 216
Coloraciones compuestas, 222
Coloraciones directas, 216
Coloraciones estructurales, 216
Coloraciones hematológicas, 235
Coloraciones histológicas, 216
Coloraciones indirectas con mordientes, 216
Coloraciones lisocrómicas, 212
Coloraciones naturales, 253
Coloraciones postvitales, 248
Coloraciones progresivas, 216
Coloraciones regresivas, 216, 320
Coloraciones subespecíficas, 222
Coloraciones topográficas, 216
Coloraciones vitales, 133, 248, 259, 275, 298
Coloraciones de cortes seriados, 261
Coloraciones en bloque, 216
Coloraciones por infiltración, 216
Coloraciones sobre portaobjetos, 216
Coloración-lacado, 302, 307
Coloración-lacado azul de metileno, 281, 302, 307
Colorante ácido, 185
Colorante básico, 185, 302
Colorante biácido, 270
Colorante dicroico, 191
Colorante intensificador, 145
Colorante sensible, 42
Colorante triácido, 219
Colorantes, 182
Colorantes minerales, 191
Colorantes naturales, 192
Colorantes negativos, 186, 191
Colorantes neutros, 183, 219
Colorantes nitrogenados, *cf.* Nitrocolorantes
Colorantes plasmáticos, 183, 188-190
Colorantes topológicos, 241
Colorantes vitales, 133, 182-184, 187-189, 191
Colorantes por fagocitosis, 191
Colores de referencia, *cf.* Códigos de colores
Colorimetría, 5
Colle, 105
Coma, 7
Combinaciones ocular-objetivo, 9

Compatibilidad fijadores-colorantes, 129
Compatibilidad fijadores-inclusiones, 128
Compatibilidad de fijadores, 126, 127
Compensador, 4
Compensador ratorio, 41
Compensador de Lépinay, 42
Compesación de colores, 65
Competición diferencial, 218
Complejo argéntico, 223
Complementarios, 4
Compuestos oxiflavónicos, 266
Compuestos pécticos, 265, 267
Concentrador, 9
Concentrador objetivo, 37
Condensador, *cf.* Concentrador
Condrioma, 13, 322
Congelación, 163, 164
Conn, 250
Conoscopia, 8
Conservación de bloques de parafina, 149
Conservación de tripanosomas, 293
Conservadores, 118
Constantes fisicoquímicas, 342
Contraste tintorial, 47
Contraste de fases, *cf.* Microscopio de contraste de fases
Cooperrider, 21
Coralina roja, 210
Coralina sódica, 265, 267
Corcho, 260, 265, 267
Corifosfina, 192, 200, 292
Corinto Congo amarillento, 199-202
Corinto intenso, 201, 203, 231
Corinto intenso violáceo, 198, 203, 231
Corneína, 264
Corning, 114, 35
Corpúsculos bacilares de los cilios, 245
Corpúsculos birrefringentes, 301
Corpúsculos cromáticos, 250
Corte, 115, 155, 161
Cortes malos, 167, 168
Cortes ultrafinos, 170
Cortes a mano alzada, 161
Cortes de celoidina, 165
Cortes de infusorios, 300
Cortes de parafina, 165
Cortes en congelación, 164, 187
Corti, 124
Cotonerol, 199, 202, 210
Cox, 248
Creosota, 177, 348
Criodesecación, 145
Criptogamas, 312
Crisoidina, 183, 199, 201
Crisoidina amarillenta, 211
Crisoidina roja, 200, 230
Cristal Ponceau rojo intenso, 200, 209-211
Cristal violeta, 189, 200, 204, 205, 213, 230, 248, 261, 321, 322, 349
Croceína brillante, 198, 200, 214
Cromafín, 232
Cromatina, 182, 245
Cromatina sexual, 321, 326
Cromato de plata, 248
Crometanol ácido, 124
Cromo, 225
Cromoformol, 128
Cromógeno, 20
Cromolipoides, *cf.* Lipofucsina
Cromoósmico, 127, 128
Cromosomas, 125, 182, 184, 187, 189
Cromotaxia, 62
Cromotropo azulado, 183, 200
Cromotropo FB, 183, 196, 199, 200, 211
Cromotropo F4B, 200
Cromotropo rubescente, 199, 200, 203
Cromotropo rubí, 195
Cropper, 274
Crozant, 162
Cruz negra, 51, 263
Cuadrícula, 68, 79
Cuadro de inclusiones, *cf.* Caja de inclusiones
Cuarto de onda, 42
Cuarzo, 41, 343
Cuarzo-halógeno, 15, 16
Cuarzo-yodo, *cf.* Cuarzo halógeno
Cubeta de tinción, 217
Cubreobjetos, 21, 33, 141
Cuchilla de diamante, 160
Cuchilla de vidrio, 160
Cuerpos grasos bacterianos, 250
Cuerpos negros, 4
Cuerpos tigroides, 247
Cuerpos de Negri, 188, 190
Cuerpos de Nissl, 183, 190
Cultivo en cámara, 139
Cultivo en gota, 139
Cultivo sobre portaobjetos, 139
Curcumina, 200, 213
Curvatura de campo, 7
Cutina, 260, 265, 267

Champeau, 39
Champy, 126, 323
Chatton, 300
Chaussier, 122
Chodat, 271
Choucroun, 96
Christiansen, 89

Da Fano, 128
Dalton, 130
Davis, 232
Decamired, 66
Deflandre, 221, 299, 311
Delaunay, 324
Deltapurpurina, 267
Densidad óptica, 90
Densidad de los ácidos, 352
Dermatófitos, 314
Derrien, 254
Desalcoholización-iluminación, *cf.* Reactivos aclarantes-desalcoholizantes
Desaminación oxidativa, 235
Desarrollo, 67
Descalcificación, 129, 131, 186
Desecación, *cf.* Deshidratación
Desfasado, 41
Deshemoglobinización, 259
Deshidratación, 145, 148
Deshidratación-aclaramiento automático, 146
Deshidrogenasa, 262
Desilificación, 131
Desmetalización, 108
Desmineralización, 131
Desparafinado, 170
Despigmentación, 132
Destrucción del citoplasma, 258
Diafanol, 132, 348
Diafragma de abertura, 32
Diamante, 348
Diamond, 278
Diatomeas, 42, 116
Diazonio, 185
Diazotación, 232
Dickson, 268
Dicroísmo de fases, 50
Dicromato de K, 123
Dicromoformomercúrico, 125
Dicromomercúrico ácido, 125
Dicromomercúrico neutro, 126
Dicromomercuroformol, 128
Dicromo-ósmico, 126
Dicromo-ósmico ácido ligero, 126
Dictiosoma, 321
Didymo, 62
Dieterle, 303
Dietilmalonilurea, 347
Dietilpseudo-isocianina, 210
Difenil-tiocarbarzone, 201
Diferencias cromáticas, 64
Difracción, 2, 28, 35
Difusión, 5
Digestión enzimática, 144
Dilución de los alcoholes, 350
Dimetilamino-azobenceno, 203
Dimetilformamida, 146
Dimetilfucsina, 189, 206
Dimetil-glioxina, 201, 226
Dimetil-tionina, 188, 230
Dioxano, 146, 147, 346
Dioxifenilalanina, 237
Disociación, 143
Dispersión, 5
Ditizone, 201
Ditricromo-ósmico, 126
DOPA, *cf.* Dioxifenilalanina
Dobell, 245, 278
Doble diafragma, 30, 31
Doble refracción, 46
Dognon, 113
Dolominici, 245
Dourine, 296
Dublin, 253
Ducomet, 267
Dufrénoy, 262
Dujardin, 30
Dunn, 254
Dupouy, 110
Duval, 152
Dyar, 265
Dyson, 41

Efecto Pelletier, 164, 166
Efecto de Berek, *cf.* Berek
Ehrlich, 218, 220, 237, 245
Elastina, 190
Elección de fijadores, 128, 129
Elftman, 234, 322
Emulsión, 66
Emulsión de color, 66
Enfoque, 19
Englobación de carbón, 105, 108
Enterocromafin, 232
Eosina, 190, 198, 349
Eosina amarillenta, 193, 202
Eosina azulada, 190, 202, 209, 211
Eosinato de azul de metileno, 220
Eosinato de dimetiltionina, 245

Eosinato de tiacinas, 219
Eosinofilia, 228
Eosinófilo, 92, 246
Epon 148
Epoxy, 148
Equidensitografía, *cf.* Equidensitometría
Equidensitometría, 69
Equivalencia Fahrenheit-Celsio, 351
Erdtman, 258
Ergastoplasma, 242, 243, 323
Eringhaus, 41
Erioglaucina, 196, 202, 208, 209
Eritrocitos, 188
Eritrosina amarillenta, 201, 202, 205, 210
Eritrosina azulada, 190, 191, 201, 202, 205, 210
Eritrosina-azul de toluidina, 310
Errera, 262
Escala cromática de Newton, 342
Escala de interferencias, 170
Escarlata, 209
Escarlata Biebrich, 185, 197, 200, 211, 324
Escarlata Cérol, 202
Escarlata croceína, 200
Escarlata intenso amarillento, 185, 204, 207, 211
Escarlata intenso rojizo, 199, 201, 204, 207, 211
Escarlata Java, 205
Escarlata Victoria, 213
Esclerénquima, 260
Esencia de Bergamota, 147
Esencia de girasol, 146, 147, 348
Esencia de madera de cedro, 147
Esencia de terebentina, 348
Esencias, 265
Espermatozoides, 190, 354
Espiroqueta icterígena, 308
Espiroquetas, 188, 190, 250, 294, 301, 302, 305
Espodógrafo, 100, 101
Espodograma, 100, 101
Espongiolina, 264
Esporas, 117, 188, 190, 258
Esporas bacterianas, 250
Esporocistos, 189
Esporozoos, 278
Esputos, 311
Estandarización, 6, 33
Estaño, 192, 226
Estereología, 92, 94
Estereomicroscopio, 15
Estereoscopia, 71
Esterificación, 236
Esterilización, 15
Esteroides, 184
Esterwax, 148, 152
Estroncio, 226
Estructura biológica, 51
Estructura teñida vitalmente, 135
Etanol, 120, 348
Etanol formolado, 126
Etanol formolado ácido, 126
Etanol mercúrico, 126
Etanol mercúrico ácido, 125
Etanol picroformolado ácido, 126
Etanol picrotricromomercúrico, 131
Etanol-acético, 126
Etanol-cloroformo-acético, 126
Éter, 348
Éter glicérico, 246
Etil eosina, 190, 202
Etoxano, 199
Eukitt, 325
Euparal, 177, 348
Examen, 115
Examen vital, *cf.* Observación vital
Excrementos, 311
Extensión en gelosa, 300
Extensión y pegado de cortes, 166
Extensiones, 136, 139, 256, 276, 280, 301, 308
Extracción de sangre, 279
Extracciones, 306, 324
Eyster, 112

Fabry, 47, 89
Fanerógamas, 118
Farrand, 114
Faulkner, 304
Fauré-Frémiet, 297
Fautrez, 254
Favard, 107
Fenacetolina, 209
Fenacina, 209
Fenilpropionato de naftol AS, 208
Fenilrosindulina, 209
Fenocloral, *cf.* Cloralfenol
Fenoformo, 177, 348
Fenol, 230, 348
Fenolsulfoneftaleína, 190, 209
Fenosafranina, 182, 209, 211
Feocromo, 232, 245
Fernández-Galiano, 323
Ferricianuro, 227
Ferrocianuro, 227
Ferrocianuro-Azul Victoria-Tanino-Safranina, 314
Feulgen, 114, 221, 229
Fialosporangios, 68
Fibras musculares, 243, 245
Fibras nerviosas, 135, 267
Fibras ópticas, 55
Fibras de colágena, 186, 189
Fibrina, 245
Fijación, 115, 119
Fijación citológica, 320
Fijación-conservación, 171
Fijación en masa, 278
Fijador, 119
Fijadores citológicos, 127
Fijadores coagulantes, 124
Fijadores de estructuras submicroscópicas, 130
Fijadores no coagulantes, 124
Fijadores para embriología, 124
Fijadores para histología, 125
Fijadores para histología y cromosomas, 125
Fijadores para inclusiones citoplasmáticas, 125
Fijadores que no aseguran la conservación de los lípidos, 126
Filtro anticalórico, 62
Filtro monocromático, 62
Filtro óptico, 61, 62
Filtro paso alto, 61
Filtro paso bajo, 61
Filtro policromático, 62
Filtro de paso banda, 61
Filtro para fluorescencia, 52, 53
Filtros líquidos, 343
Final de la fijación, 129
Flagelados, 290, 292
Flagelos, 290, 291, 297
Flagelos bacterianos, 250
Fleisch, 352
Flemming, 121, 122, 125, 127
Florence, 257
Floroglucina, 264, 267
Flotación, 113
Floxina, 201, 202, 208, 209
Floxina azulada, 190, 201, 202, 206, 209
Fluoresceína, 193, 204, 213
Fluorescencia, 52, 61, 254, 292, 301, 324
Fluorocromo ácido-resistente, 250
Fluorocromos, 53, 183, 191-193, 250
Fluoromicroscopia, *cf.* Fluorescencia
Fluoruro, 227
Fonbrune, 84, 134
Fondo claro, 30, 61
Fondo oscuro, 34, 47, 60, 283, 306
Formacético mercúrico, 124
Formaldehído, 122
Formazan, 223
Formocadmio, 125
Formodicromato débil, 126
Formol cadmiocálcico, 129
Formomercúrico crómico, 126
Formomercúrico tricloroacético, 125
Formopicromercúrico tricloroacético, 125
Formopicromoácido, 125
Formotricromato acético, 125
Formotricromoácido, 125
Fosfato amónico magnésico, 266
Fosfato cálcico, 266
Fosfato de K, 347
Fosfina, 191, 193, 206, 209, 214
Fosfórico, 227, 266
Fotomacrografía, 59, 60
Fotométrico, *cf.* Microfotómetro y Microespectrofotómetro
Fotomicrografía, 56, 60
Fotosensible, 3
Fotosíntesis, 68
Fractografía *cf.* Fracturas
Fracturas, 108
Françon, 41
Fresnel, 2
Frommer, 220
Frotis, *cf.* Extensión
Fucsina ácida, 195, 349
Fucsina ácida trisulfonada, 206
Fucsina básica, 189, 349
Fucsina fenicada, 249, 314
Fucsina-paraldehído, *cf.* Pararrosanilina-diparaldehído
Fuerza iónica, *cf.* P_H
Fuerzas de van der Waals, 219
Fusey, 42, 103

Gabe, 133, 154, 237, 243, 316, 320, 324
Gabriel, 118
Gaïacol, 147, 315
Gaillard, 270
Galactógeno, 251, 252
Galeína, 195, 204
Gallocianina, 187, 195, 199, 204, 247
Gambine, 204
Gametos, 279

Garrett, 268
Gaussen, 251
Gauzit, 110
Gavaudan, 82
Gay-Lussac, 350
Gelatina, 148, 154
Gelatina cádmica, 176
Gelatina glicerinada, 176, 348
Gelatina salada, 301
Gelosa, 148, 154
Gel de sílice, 148, 172
Geranina amarillenta, 204
Geranina azulada, 202, 204
Gerard, 125
Giemsa, 219, 280
Giemsa-tanino, 302
Giesson, 184
Gilbert, 238, 252
Gilson, 125, 174
Gingrich, 280
Gins, 307
Giroud, 257
Glicerina, 98, 348
Glicerina boratada, 175
Glicerina gelatinada, *cf.* Gelatina glicerinada
Glicerina yodomercúrica, 175, 238, 349
Glicero-hemalumbre, 300
Glicina, 347
Glóbulo blanco, *cf.* Leucocito
Glóbulo rojo, *cf.* Hematíe, eritrocito
Glosario, 194
Glucinio, *cf.* Berilio
Glucógeno, 189, 238, 251, 263
Glucolípidos, 235
Glucoproteínas, 235
Glucósidos, 263
Glutaraldehído, 130
Godfrin, 260
Goldner, 243
Golgi, 248, 321
Goma, 265, 267
Goma arábiga, 148, 258, 348
Goma salicilada, 176
Goma de adraganto, 298
Goma de cerezo, 148, 154
Goma de cloral 176, 316
Gomori, 243
Gota gruesa, 280
Gota pendiente, 133, 135
Gotas de gramo, 352
Gouillart, 256
Grados termométricos, 351
Gram, 249, 264, 267, 314
Gram-eosina, 310
Granate intenso clorado, 204
Granate intenso GBC, 198, 203, 211, 231
Granate intenso GBC básico, 203
Granate intenso GC, 201, 203
Granate intenso sulfato, 204
Granate sólido GC, 231
Grano de acitomicetos, 309
Granos de secreción, 242, 245, 246, 323
Gránulo espiroquetógeno, 306
Gray, 150
Gregarina, 289
Grenacher, 259
Gris, 5
Gros, 248
Grosor del cubreobjetos, 80
Gruber, 14, 151
Guard, 326
Guéguen, 270
Guénéau de Lamarlière, 260
Guezda, 262
Guilliermond, 266
Gurning, 327
Gutstein, 312, 313

Halmi, 125
Hank, 113
Hannover, 122
Hansen, 220, 312
Harris Shorr, 324, 325
Hartig, 234
Harting, 140
Hayes, 234
Heidenhain, 122, 125, 243, 245, 316, 320, 323
Helly, 125
Hemalumbre, 220, 221, 242, 300
Hemalumbre-rojo Congo, 252
Hemateína, 192, 205
Hemateína alcohólica, 242
Hemateína IA, 221
Hematexodios, 280
Hematíe, 92, 245, 251, 277
Hematoblasto, 279
Hematología, 245
Hematoxilina, 192, 205, 220, 277, 278, 300, 325, 349
Hematoxilina alumínica, 300
Hematoxilina fosfotúngstica, 277
Hematoxilina-Molibdato de amonio, 277
Hemina, 256
Hemocultivo, 295
Hemoglobina, 188, 254
Hemosiderina, 255
Hemosporidios, 278
Hemozoína, 225
Henry, 192
Hermann, 125, 127
Hexametilentetramina, 223
Hideux, 258
Hidrato de cloral, *cf.* Cloral
Hidrólisis ácida, 262
Hidrólisis básica, 262
Hierro, 191, 225, 255
Hierro para cementar, 179
Hígado, 191
Himes, 238
Hipoclorito, 132, 259
Hipocloroso, 226
Hipofosforoso, 227
Hirschler, 128
Histiocitos, 135
Histología animal, 244, 245
Histología vegetal, 242, 258
Historradiografía, 100
Hoffman, 302
Hojas desechables, 317
Holmes, 140
Holzer, 249
Hollande, 125
Hongos, 101, 118, 182, 184, 186, 187, 189, 190, 234, 267, 309, 314
Hongos de las tiñas, 314
Horno de Policard, 100
Hueck, 253
Huella, 108
Hueso, 135, 182, 187, 190, 191
Hunton, 312
Hurel-Py, 266
Hyrax, 348

I. G., Farben, 312
I. I., *cf.* Infrarrojo
Iluminación, 24
Iluminación crítica, 30
Iluminación incidente, *cf.* Luz reflejada
Iluminación oblicua, 27
Iluminación policromática, 68
Imágenes, 5, 8, 35, 42, 56
Imágenes defectuosas, 32
Impregnación, 215, 301
Impregnación argéntica, 253, 277, 305, 322, 323
Impregnación argéntica sobre frotis, 301
Impregnación argéntica, tras inclusión, 301
Impregnación aúrica, 248
Impregnación metálica, 302, 303
Impregnación Oro-Plata, 248
Impregnación ósmica, 248, 321
Impregnación con plata reducida, 300
Impregnación en bloque, 220, 302
Impregnación-reducción, 248
Inclusión celoidina-parafina, 155
Inclusión citoplasmática, 125
Inclusión gelosa-parafina, 155, 300
Inclusión hidrófila, 154
Inclusión lipídica, 26
Inclusión mixta, 155
Inclusión en celoidina, 152
Inclusión en gelatina, 154
Inclusión en gelosa, 154
Inclusión en parafina, 148
Inclusión en polietilen glicoles, 154
Inclusión en un gel de sílice, 172
Inclusiones en resinas epoxy, 153
Índice parasitario, 285
Índice de legibilidad, 327
Índice de refracción, 98, 348
Índice de visibilidad, 178
Índigo, 205
Índigo-carmín, 205
Indulina hidrosoluble, 186, 203
Indulinas, 186, 211
Infiltración, 221
Infrarrojo, 3, 39, 40
Infusorios, 296, 300
Inmersión, 10, 11, 36, 38
Inmovilización, 301
Inmunoferritina, 54
Insectos, 187, 188, 191
Intensidad luminosa, 29
Intensificadores de contraste, 145
Interfaco, 41
Interferencia, 2, 41
Inulina, 263, 267
Inyección de una masa teñida, 191, 216

James, 280
Jamin, 41
Jarabe de Apathy, 176, 348
Jenner, 219
Johnson, 128
Joule, 4
Joyet-Lavergne, 257
Jussieu, 121

Karpechenko, 125
Kasten, 228
Klima, 146
Klüver, 233
Knop, 354
Kodak, 62, 65, 98, 344, 345, 349
Kolster, 128
Kopsch, 128, 248
Korotneff, 119
Kossek, 15
Köfler, 82
Köhler, 30, 41
Kölpin Ravn, 268
Krauss, 302
Kufferath, 118, 314
Kühner, 262, 271, 313
Kühnholtz-Lordat, 260

Laca, 182, 183, 186, 187
Laca alumínica de azul ácido de alizarina, 247
Laca alumínica de azul de gallamina, 221
Laca crómica de gallocianina, 220, 237, 247
Laca cúprica de hematoxilina, 320
Laca de carmín, 221
Laca de hematoxilina, 320
Lacado, *cf.* Deshemoglobinación
Lacas crómicas progresivas de hemateína, 242
Lacas férricas de hematoxilina, 320
Lacas progresivas de hemateína, 242
Lacas progresivas de hematoxilina, 220
Lacmoide, 187, 206
Lactocloral, 11, 175
Lactofenol, 11, 174, 232
Lactofenol cúprico, 118, 175
Lagerheim, 263
Laguesse, 127
Lagunas, 236, 247
Laidlaw, 219
Lambert, 29, 254
Lámina filtrante, 41
Lámina semi-onda, 41
Lámina de fases, *cf.* Placa de fases
Lámpara incandescente, 15
Lámpara de arco, 16
Lámpara de gas, 15
Lámpara de iluminación electrónica, 18
Lang, 122
Langeron, 8, 270, 352
Láser, 84
Lasnier, 254
Látex, 261
Laveran, 217
Le Chatelier, 13
Le Gall, 232
Lebedeff, 41
Leblond, 257
Leduc, 154
Legendre, 283
Legroux, 312
Leifson, 250
Leins, 258
Leishman, 219
Leismaniosis, 296
Leitz-Wetzlar, 6, 16, 17, 36, 53, 76, 90, 91, 163
Lelong, 162
Léobardy, 308
Lépine, 287
Leptospiras, 308
Leroux, 38
Lesiones, 306
Leuckart, 150
Leucocito, 92
Leucocitos pigmentados, 279
Leucoderivado, 219, 229, 254
Levaduras, 184, 188, 189, 313
Lévy, 308
Lewitsky, 126
Licor de Roche, 295
Lignificado, 259, 260, 264, 267
Ligroína, 308
Lillie, 140-142, 219, 230, 236, 246, 347
Límite de resolución, *cf.* Poder de resolución
Limpieza, 21, 93, 173
Lindsay, 127
Linfocitos, 188
Linfoides, 246
Lípidos, 232, 265, 267
Lipofucsina, 184, 187, 234, 253
Líquido amoniacal azucarado, 316
Líquido cefalorraquídeo, 294
Lisocromo, 182-184, 187, 232
Lisocromos fluorescentes, 233
Lison, 235, 254, 257
Litmus, 192
Localización de pigmentos, 252
Locke, 140
Locquin, 5, 41, 42, 50, 68, 70, 71, 81, 82, 91, 109, 118, 123, 126, 145, 156, 232-235, 252, 272, 321, 343
Loeffler, 250
Longitud de onda, 2, 3
Longitud de onda dominante, 5
Ludloff, 298
Luft, 130
Lugol, 238, 270, 276, 311, 312
Lugol-tinta China, 312
Lupa binocular, *cf.* Estereomicroscopio
Lutz, 118
Luz, 2, 15
Luz diurna, 15
Luz reflejada, 35, 59
Lyot, 89

Mac Neal, 219
Macchiavello, 287
Maceración, 132
Mach, 41
Machado, 315
Madera, 260, 264, 267
Madureira Para, 304
Magnan, 110
Magnesio, 119, 225
Magneson, 225
Magnetoscopio, 55
Magrou, 312
Maire, 118, 123, 134, 179, 271
Malassez, 92, 169
Malençon, 118
Manantiales, 2, 15, 113
Manganeso, 227
Mangenot, 265
Mangin, 262, 268
Mann, 217, 245, 270, 277, 310
Marcano, 92
Marceau, 258
Markey, 278
Martin y Leboeuf, 293
Martoja, 243
Massa, 257
Masson, 158, 183, 220, 243
Massues, 310
Mast cells (mastocitos), 188-191
Mastic, 179
Material seco, 117
Materias colorantes, 218
Materias minerales, 265
Matthey, 323
Maule, 264
Maximov, 126, 128
May Grünwald, 219
May Grünwald-Giemsa, 325
Mayer, 169, 221, 252
Maysel, 122
MEB, *cf.* Microscopio electrónico de barrido
MET, *cf.* Microscopio electrónico de transmisión
Mecánica, 10
Medidas de ángulos, 80
Medidas de longitud, 76
Medidas de peso, 79
Medidas de superficie, 79
Medidas de volumen, 79
Medidas para altas temperaturas, 345
Medios equilibrados, 139
Medios temporales, 174
Médula ósea, 188, 190
Médula de saúco, 162, 301
Melaninas, 131, 253
Melzer, 238, 270, 275
Membranas soporte, 171
Mentol, 119
Mercurio, 225, 248
Mercuroacético, 124
Mercurocromo «220», 190, 206
Mersol, 348
Mesves, 127
Metabisulfito de K, 234
Metacrilato, 148, 153, 348
Metacromasia, *cf.* Metacromático
Metacromático, 182, 187-189, 235, 250
Metacromatropo, *cf.* Metacromático
Metalización, 104, 108
Metaloproteínas, 235
Metanal, *cf.* Formaldehído
Metanol, 348
Metil primulina, 191, 193
Metil tiazolildifenil tetrazolium, 198, 207
Metilación reversible, 236
Metilal, 146, 147
Método, *cf.* Nombre del autor
Métodos micológicos, 309
Mezclas crómicas, 128
Mezclas cromoósmicas, 127
Mezclas fijadoras, 124
Mica, 41
Micelio, 268
Micobacterias, 250
Micofitopatología, 267
Micología, 235, 237, 264, 267, 270, 309, 314
Micorrizas, 184, 189, 268
Microacuario, 135
Microaguja, 85
Microcirugía, 83
Microcompresor, 81

Microcuantímetro, 95, 96
Microdisección, 5, 85, 105
Microelectroforesis, 96
Microescalpelo, 88
Microespectrofotómetro, 90
Microespectrógrafo, 90
Microestereoproyector, 13
Microfluoroscopia, 302
Microfotografía, *cf.* Fotomicrografía
Microfotómetro, 90
Microincineración, 100, 226
Microinterferómetro, 17
Micromanipulación, 83-85, 134
Micromanipulador, 85
Micrométodos térmicos, 97
Micrómetro, 77
Micropipeta, 85-87, 138
Microplatina calefactora, 97
Microplatina refrigeradora, 97
Microrradiografía, 100
Microrrefractometría, 97
Microscopia de fluorescencia, *cf.* Fluorescencia
Microscopio electrónico de barrido, 101, 223
Microscopio electrónico de transmisión, 108
Microscopio invertido, 13
Microscopio iónico, 110
Microscopio protónico, 110
Microscopio de alta presión, 82
Microscopio de contraste interferencial, 42
Microscopio de contraste de fases, 42, 45
Microscopio de investigación, 12, 37, 56
Microscopio de luz polarizada, 41, 45, 48
Microsonda, 83
Microsoplete, 84
Microsublimación, 97
Microtomización, 156, 161
Micrótomo, 155
Micrótomo de congelación, 163
Micrótomo de mano, 162
Michaelis, 142
Mielina, 184, 187, 249
Mieloides, 246
Milochevitch, 315
Millipore, 92
Millon, 114, 262, 263
Millot, 243
Minot, 156, 164, 166
Mirande, 259
Mitocondrias, 183, 189, 251
Mixosporidios, 289
Modecla, 41
Modulador pupilar, 40
Molisch, 263
Möllendorf, 219
Mollier, 182
Monocromator, 89
Monometil pararrosanilina, 211
Monometil tionina, 188, 197
Monpillard, 343
Monroe, 220
Montaje, 115, 172
Montaje permanente, 175
Montaje de material no teñido, 261
Moog, 237
Mordiente, 219
Morfina, 119
Morfometría, 94
Moriber, 228
Morin, 207
Morquer, 264
Morrison, 271
Movimiento Browniano, 34
Movimiento delicado, *cf.* Tornillo micrométrico
Movimiento de cilios, 298
Mucílagos, 265, 298
Mucílagos pécticos, *cf.* Pectinas
Mucina, 184, 187-189, 242, 245, 246
Mucopoliósidos, 235, 251
Mucoproteínas, 235
Mucosa gástrica, 187
Mucosustancias, 235, 252
Müller, 123
Murray, 132

Nadi, 237, 265
Naftol AS-AN, 207
Naftol AS-BA, 207
Naftol AS-BI, 207
Naftol AS-CL, 207
Naftol AS-E, 207
Naftol AS-KB, 207
Naftol AS-LC, 207
Naftol AS-MX, 208
Naftol AS-TR, 208
Nägeli, 311
Nageotte, 249
Nanofósil, 68
Naranja I, 195, 196, 203, 213
Naranja II, 195, 205, 209, 213, 349
Naranja IV, 195, 213
Naranja amarillento, 195, 214
Naranja brillante ON, 198
Naranja brillante rojizo, 198
Naranja colofán, 286
Naranja croceína-amarillento, 200
Naranja cromo amarillo rojizo, 198, 199
Naranja cromo rojizo, 198, 209
Naranja Flazo, 204
Naranja G, 183, 205, 209, 349
Naranja G-Cristal violeta, 220
Naranja intenso amarillo rojizo, 203, 231
Naranja permanente rojizo, 209
Naranja S, 209
Naranja Sudán amarillento, 183, 199, 204, 209, 211
Naranja Sudán rojizo, 203, 204, 209, 211
Naranja de acridina, 191, 193 195, 203
Naranja de alizarina, 195
Naranja de bencilo, 197
Naranja de cromo, 199
Naranja de cromo amarillo rojizo, 198, 207
Naranja de etilo, 202
Naranja de medida, 197
Naranja de mercurio, 206
Naranja de metilo, 195, 205, 209, 213
Narceína II, 208
Narcótico, 119
Nassonov, 322, 323
Navaja, 156
Navaschin, 125
Negro carbonoso amarillento, 195, 199, 207, 212
Negro cromo palatino, 207, 209, 212
Negro cromogen, 200, 202, 212
Negro diamante oscuro, 199, 201, 211
Negro directo profundo, 197, 201, 210
Negro intenso azulado, 197, 203, 207, 231
Negro intenso K, 185, 197, 203, 207, 231
Negro Janus, 201, 205
Negro salicina, 199, 202, 211
Negro Sudán azulado, 211
Negro Sudán B, 184, 249
Negro de carbón, 191, 199
Negro de clorazol, 185, 200, 202, 210
Negroni, 312
Nemátodos, 187
Neoazul rojizo, 203, 205-209
Neoazul Sudán amarillento, 211
Neoazul de metileno, 208
Neodina, 343
Neofucsina, 189, 204-208
Neotetrazolium, 186, 208, 209
Netien, 264
Neubauer, 92
Neubert, 247
Neurofibrillas, 247, 248
Neuroglia, 190
Neuroplasma, 248
Neutrófilo, 246
Newton, 342
Nigrosín, 205, 208, 221, 311, 349
Nigrosín sulfonado, 186, 205, 208
Nikon, 57, 58
Ninhidrina-Schiff, 235
Níquel, 226, 262, 343
Nissl, 247
Nitrato *cf.* Nítrico
Nitrato de plata litinado, 304, 305
Nitrato de uranio, 303
Nítrico, 227
Nitrito, *cf.* Nitroso
Nitrito de Na, 343
Nitro azul de tetrazolium, 208
Nitroamina, 209
Nitrobenceno, 343
Nitrocelulosa, *cf.* Celoidina
Nitrocolorantes, 186
Nitrofenol, 209
Nitroprusiato, 227
Nitroso, 227
Noël Bernard, 269
Nomarski, 41, 43, 97
Normalización mecánica, 6
Nuclear, *cf.* Núcleo
Núcleo, 117, 182, 183, 187-191, 242-244, 250, 251, 321
Nucléolo, 245, 321
Nucleonema, 321
Numeración, 92, 274, 285

Objetivos, 9, 24
Objetivos catadióptricos, 39, 97
Objetos-test, *cf.* Preparación test
Observación, 22, 24
Observación vital, 133
Ocular, 9, 24
Ocular goniométrico, 80
Ojo, 3, 4, 22
Opaco iluminador, *cf.* Luz reflejada
Orceína, 192, 209
Orceína acética, 271
Orceína-lactoacética, 217

Organismo espiral, 301
Orgánulo intracelular, 323
Oro, 224
Oro coloidal, 191
Orsellina azulada, 184, 209
Orth, 128
Ortocresol benceína, 209
Ortodianisidina, 230
Osmiodicromato, 128
Osmiodicromocloroplatínico, 128
Osmioditricromósmico, 128
Osmio-Giemsa-Tanino, 302
Osmiomercúrico, 126
Osmio-yoduro de zinc, 248
Osmodiálisis, 142
Osram, 17
Osteocitos, 246
Osterberg, 41
Oxacinas, 187, 259
Oxalato cálcico, 266
Oxalato de Na, 347
Oxálico, 227
Oxicarmín, 199
Oxidación, 236
Oxidación perácida, 233
Oxidasas, 237
Oxiflavonas, 266

PAS, *cf.* Ácido periódico-Schiff
Palade, 130
Paladio, 226
Palinología, 258
Paludismo, 278
Pancromático, 246, 302
Panóptica, 242, 245, 302
Panóptica triácida, 220
Papanicolaou, 183, 223, 325
Pappenheim, 220, 238, 246
Paracresol-tirosinasa, 271
Parafenileno diamina-agua oxigenada, 230
Parafina, 148
Paraldehído, *cf.* Pararrosanilina-diparaldehído
Paranitrobenceno azorresorcinol, 201
Pararrosanilina, 189, 196, 197, 209, 228, 259, 264, 267
Pararrosanilina amoniacal, 267
Pararrosanilina diparaldehído, 228
Parasitología, 220
Parásitos endocelulares, 245
Parásitos de vegetales, 183, 184, 187
Pardo Bismarck, 199
Pardo Bismarck amarillento, 197, 203, 206
Pardo Bismark rojizo, 184, 197, 198, 206, 230
Pardo Bismark Y, 184
Pardo Congo amarillento, 198, 200, 203
Pardo intenso amarillento, 185
Pardo intenso rojizo, 197, 199, 203, 231
Pardo intenso violáceo, 203, 231
Pardo liposoluble, 199
Pardo liposoluble amarillento, 209, 211
Pardo Phénix rojizo, 198
Pardo Sudán azulado, 183, 198, 203, 209, 211
Pared cutinizada, 265
Pared lignificada, 264
Paredes vegetales, 262, 264
Parénquima, 260
Paretoxicrisoidina, 202
Parlodion, *cf.* Celoidina
Partículas, 3
Parvan, 280
Pasini, 247
Pasternack, 245
PBPP, 251
Pearse, 141, 235
Pectinas, 191
Pectocelulosas, 260
Pegado, colodionaje y peliculado, 317
Pegado con saliva, 299
Pélissier, 118
Pelletier, 97, 164, 166
Penetración, 128
Pentametilpararrosanilina, 207
Perclórico, 226
Perenyi, 124
Peridio, 237
Peritecios, 314
Perls, 255
Permanganato, 132, 227, 264
Peroxidasas, 255
Perreau, 103, 104
Perrot, 47, 89
Pesez, 259
Peso atómico, 353
Peso molecular, 347
Peso seco, 113
Petit, 260
Pétri, 149
pH, 247, 259, 346
Philips, 16, 106, 107
Philpot, 41
Phtalocianinas, 187, 233
Phtalocinina cúprica, 238
PIC-Hemalumbre, *cf.* Picroindigocarmín-hemalumbre
PIC-Pararrosanilina, 251
PIC-Rojo nuclear sólido, 251
PIN-Rojo nuclear sólido, 251
PIT-Hematoxilina, 251
Picrato de rosanilina, 220
Picrato de verde de metilo, 322
Picroformol ácido, 125
Picroformol cúprico, 125
Picroformol mercurocúprico, 125
Picroindigocarmín-Hemalumbre, 251
Pictet, 140
Pigmentos, 252
Pigmentos tetrapirrólicos, 254
Pinacianol, 185, 210, 211
Pinacromo, 209
Piramidación, *cf.* Microtomización
Piramidado del bloque, 166
Pirazolonas, 187
Piridina, 132
Pirogalol-hierro, 321
Pironina amarillenta, 190, 210
Pironina azulada, 190, 210, 230, 349
Piroplasmas, 286
Pischinger, 219
Placa de fases, 41, 44
Placa de fases compleja, 41
Placa de fases interferencial, 41
Placa de fases rotatoria, 41
Placa de fases de media onda, 41
Planicidad del campo, 7
Planímetro, 79
Plank, 2
Plaquetas, *cf.* Trombocitos
Plasmalógenos, 234
Plasmodios, 279, 285
Plasmólisis, *cf.* Osmodiálisis
Plata, 223
Plata coloidal, 191
Platina, 226
Platina calefactora, 169
Platina con carro móvil, 23
Platina de gran temperatura, 345
Pleocroísmo, 50
Plimetinas, 191
Plomo, 226
Poder reductor, 223
Poder de resolución, 9, 10
Polar, 46, 47
Polarización, 46, 342
Polarización circular, 41
Policarbonatos, 317
Policard, 100, 108, 109, 156
Policromo azul, 236
Polietilen glicol, 148, 154
Polifeniloxidasa, 237
Poliholósidos, 235
Poliósidos, 235
Polipéptidos, 271
Polisacáridos, 242, 252
Polivinil lactofenol, 176, 348
Ponceau azulado, 184, 210
Ponceau GR, 11, 204, 210
Ponceau rojizo, 198
Ponceau rubescente, 183, 195, 206, 208, 210, 211, 214
Ponceau sulfurin, 203
Ponceau 2R, 183
Porfirinas, 254
Portaobjeto, 33
Portaobjetos delgados, 143
Portaobjetos esmerilado, 89, 283
Post, 262
Postcromización controlada, 234
Potasa, 315
Potasio, 225
Poujol, 164
Poux, 103
Pratt, 262
Precaución, 19, 28
Precipitación-adsorción, 218
Precipitación-centrifugación química, 294
Prenant, 320
Preparación, 172
Preparación *in vivo*, 135
Preparación test, 116
Presión osmótica, 112, 130
Preyer, 119
Primulina, 191, 193, 210, 302
Prisma de Borrel, 146
Profundidad del campo, 7
Prolabo, 169, 217
Prontosil, 210, 211, 312
Propil alfanaftol naranja, 210
Protargol, 253
Protector de objetivos, 97
Proteínas, 186
Proteínas básicas, 186
Proteinato de plata, 210, 211
Prótidos, 234, 262
Protistas, 100
Protistología, 273
Protozoómetro, 274
Protozoos, 184, 186, 187, 189, 274, 285

Proyector, 6
Pseudoisocianina, 191
Pulido, 159
Punción ganglionar, 295, 324
Punción lumbar, 295
Punto crítico, 146
Punto de fusión, 345
Púrpura brillante, 198
Púrpura brillante R, 184
Púrpura de Hesse, 202, 205
Púrpura de Hirckson, 205
Purpurina, 182, 195, 210
Purpurina brillante rojiza, 202
Pus, 310, 311

Quanta, 52
Queratina, 135, 245, 252, 264
Queratohialina, 252
Quinalizarina, 195, 209
Quinina, 262, 343
Quinn, 220
Quinolinas, 185
Quinolinol, 210
Quinona oxina, 187
Quistes, 258, 275
Quitina, 131, 252, 264

R. X., *cf.* Rayos X
Radiación, 2, 3
Radiancia, 3
Rafidios, 266
Raleigh, 9
Ramón y Cajal, 128, 248
Randolph, 92
Ranvier, 121, 133, 144, 267
Raspail, 100
Rayas de mercurio, 343, 345
Rayo extraordinario, 46
Rayo ordinario, 46
Rayos X, 2, 100, 103, 104
Reacción, *cf.* Nombre del autor o del compuesto químico
Reacción nuclear, 221
Reacción pseudoplasmal, 234
Reactivos aclarantes desalcoholizantes, 147, 149
Réaumur, 121
Rebière, 149
Reconstrucciones, 71
Reflectografía, *cf.* Luz reflejada
Reflejos parásitos, 11
Reflexión, 5
Refracción, 27
Regaud, 126, 128, 320
Regeneración, 117
Reichert Wien, 37, 97
Reilhes, 263
Rejalgar, 348
Rejilla, 171
Reonina, 193, 203, 210
Réplicas, 108, 136, 270
Resina, 266, 267
Resina Dammar, 177, 348
Resina Epoxy, *cf.* Epoxy
Resina Epoxy miscible en agua, 153, 154
Resina mástic, 176
Resina de paracumarona, 177, 349
Resinas sintéticas diversas, 177
Reticulocitos, 92
Retina, *cf.* Ojo
Revólver portaobjetivos, 21
Rezazurina, 210
R_h, 120
Rheinberg, 63, 68
Ricard, 103
Ricketsias, 188, 245, 286
Ringer, 140, 354
Ringer-Locke, 140, 354
Riñón, 190
Río Hortega, 249
Rivalol, 195
Rivanol, 193, 210, 302
Rocellina, 195, 199, 204, 210
Roche, 353
Rodamina, 192, 210
Rodamina amarillenta, 193, 210, 230
Rodamina azulada, 190, 192, 210
Rodamina B, 198
Rodamina muy amarilla, 199
Rodamina 5G, 343
Rojo al aceite O, 185
Rojo ácido de alizarina azul, 194, 212
Rojo Astrazán, 196, 204
Rojo Astrazon FG, 191
Rojo bencil intenso, 195, 196, 198, 259
Rojo Congo, 187, 200, 202, 267
Rojo caricinel, 199
Rojo coccinela, 202
Rojo cromado de antraceno, 194, 196, 252
Rojo cromado de antraceno A, 194, 198, 199, 202
Rojo Darrow, 201
Rojo diazo, 201
Rojo eriocromo azulado, 200-202
Rojo heptametoxilo, 205
Rojo hexametoxilo, 205
Rojo intenso, 209, 231
Rojo intenso AL, 186, 196, 204, 207, 210
Rojo intenso amarillento, 201, 203, 204, 210
Rojo intenso azulado, 185, 203, 210, 231
Rojo intenso continental, 199, 201, 204
Rojo intenso débil, 204, 210
Rojo intenso LTR, 198, 204, 207, 210
Rojo intenso rojizo, 204, 210
Rojo Janus azulado, 205
Rojo lanoso muy azulado, 195, 203, 214
Rojo liposoluble EGN, 209
Rojo liposoluble naranja, 184, 209
Rojo Magdala, 182, 206, 208, 210, 211
Rojo Milling azulado, 207
Rojo neutro, 182, 208, 211, 212, 230, 349
Rojo neutro-verde luz de Twort, 220
Rojo nuclear sólido, 182
Rojo pentametoxilo, 209
Rojo permanente, 197, 204, 209
Rojo puro de calcio, 199, 206, 211
Rojo Sirius amarillento, 211
Rojo Sirius azulado, 185, 199, 201, 203, 210
Rojo Sirius muy azul, 185, 199, 201, 210, 211
Rojo Sorbina, 196, 203
Rojo Sudán amarillento, 198, 209, 211
Rojo Sudán azul intenso, 211
Rojo Sudán azulado, 211
Rojo Sudán muy azul, 209
Rojo tiazina amarillento, 199
Rojo tiazina rojizo, 183, 212
Rojo tripán, 184, 212
Rojo vital, 184, 197-202, 210, 213
Rojo vital nuevo, 213
Rojo de acridina azulado, 195
Rojo de alizarina, 182, 195
Rojo de amidonaftol, 183, 196
Rojo de amidonaftol azul intenso, 196
Rojo de amidonaftol azulado, 196, 206
Rojo de amidonaftol GA, 196, 203
Rojo de diquinolina, 202
Rojo de etilo, 202
Rojo de metametilo, 206
Rojo de metilo, 206
Rojo de naftilo, 196, 208
Rojo de parametilo, 209
Rojo de primer orden, 41
Rojo de propil, 210
Rojo de quinaldina, 210
Rojo de rutenio, 191, 211, 237, 252, 259, 265, 267, 268
Romagnesi, 271
Romanovsky, 219, 277, 280, 302, 305
Rondeau de Noyer, 179, 316
Rosa Astrazán, 196, 204
Rosa Bengala, 193, 197, 211
Rosa Bengala amarillenta, 191, 197
Rosa Sirius azulada, 203, 204, 211
Rosanilina, 189, 206, 211
Rosanilina ácido trisulfonada, 189, 195, 204, 211, 230, 322
Rosanilina ácido trisulfonada-azul de metileno, 220
Rosazurina, 269
Ross, 280
Rossenbeck, 221
Rotura de enlaces, 219
Rousselet, 119
Rubenaite, 230
Rubidio, 226
Rubin heliocstable, 199, 205, 206, 209
Ruffer, 117
Ruyter, 170

Sabouraud, 314
Sabrazès, 302
Safranina, 182, 200, 205, 211, 230, 267, 323, 349
Safranina-azul de metilo, 261
Safranina-Hemalumbre, 261
Safranina-Tinta férrica, 261
Safranina-Verde intenso, 220
Safranina-Verde luz, 261, 320
Sales de mercurio, 223
Salicilato, 117, 175, 348
Sanfelice, 125
Sangre, 188, 245, 257, 293, 294
Sarcosporidios, 290
Saturación, 5
Sauvageau, 267
Savart, 41
Savons, 148, 154
Scotch, 270
Schaffer, 126
Schaudin, 135, 276, 278
Schellack, 305
Schiff, 219, 221, 229, 230, 234
Schouten, 88
Schultze, 248
Schulze, 123
Schwarzschild, 40

Schweitzer, 263
SEM, *cf.* Microscopio electrónico de barrido
Séguin, 306
Selenio, 192
Selgiman, 234
Semichon, 118, 299
Sénarmont, 41
Shandon-Elliott, 222
Shellac, 148
Shinya Inoué, 51
Shorr, 325
Siderofilia, 234
Siderofilia coloidal, 236
Siderorresistencia, 250
Siemens, 102
Sífilis, 307
Silicio, 148, 172, 227, 266, 348
Simitch, 275
Simon, 294
Simons, 284
Singh, 271
Sinonimias de colorantes, 194
Sistema retículo-endotelial, 184
Sistema vascular de las plantas, 184
Sjöstrand, 130
Smith, 42
Smyth, 257
S.N.M., *cf.* Stiassnie
Sobreplatina, 81
Sodio, 17, 117, 226, 346, 347
Sohier, 277
Sol, 42
Solarización, 69
Solución tampón, 140
Soluciones isotónicas, 354
Soluciones teñidas, 5
Sombreado, *cf.* Metalización
Spath, 41
Spierer, 41
Statkewitsch, 297, 298
Steimetz, 228
Stein, 225
Stiassnie, 12, 159, 166
Stieve, 124
Strzysowski, 257
Styrax, 348
Súber, 261, 265, 267
Sublimado, *cf.* Cloruro mercúrico
Sudán II, 183, 203, 204, 209, 211
Sudán III, 183, 199, 202, 204, 209, 211, 267
Sudán III al lactofenol, 267, 270, 349
Sudán IV, 184, 199, 202, 204, 209, 211, 349
Sulfato, *cf.* Sulfúrico
Sulfato de cobre, 343
Sulfato de níquel, 262
Sulfoaldehídos, 271
Sulfobenzaldehído, 272
Sulfocarbonato de zinc, 348
Sulfocianuro, *cf.* Tiocianato
Sulforodamina, 192, 212
Sulforodamina B, 195, 206
Sulfovanillina, 272
Sulfuro, 227
Sulfuro de carbono, 147, 348
Superficie fotosensible, 4
Superposición, 69, 71
Susa de Heidenhain, 125
Suter, 283
Syrax, 349
Szygmondi, 35

Tabuis, 110
Talio, 192, 226
Talos, 267
Tampones, 140, 347
Tanático, 119
Tanino, 262, 266, 267
Tanino-safranina, 314
Tanino-verde de Guinea, 313
Tanofilia, 234
Tartárico, 227
Tartracina, 195, 212, 214
Tauber, 257
Taylor, 41
TEM, *cf.* Microscopio electrónico de transmisión
Técnicas, *cf.* Nombre del autor
Técnicas eliminadas, 316
Técnicas micológicas, 270
Técnicas vegetales, 258
Técnicas zoopatológicas, 309
Tegumentos, 252
Teichmann, 257
Teilerias, 286
Tejido conectivo, 183, 184, 188, 189
Tejido conjuntivo, *cf.* Tejido conectivo
Tejido criboso, 265
Tejidos cutinizados, 183
Tejidos elásticos, 189
Tejidos leñosos, *cf.* Tejidos lignificados
Tejidos lignificados, 189, 191
Tejidos nerviosos, 182, 183, 189, 190
Tejidos suberificados, 183
Telemicroscopio, 54
Televisión, *cf.* Cámara de televisión
Teoría química de la tinción, 218
Tergitol, 278
Termodesecación, 145
Terpineol, 147, 348
Tetraciclina, 192
Tetracloruro de carbono, 343
Tetracromo, 219
Tetrametil rodamina isotiocianato, 192
Tetraóxido de osmio, 123, 127, 223, 233
Tetrazolium, 185, 223
Tetrazonio, 185
Tian, 353
Tiazinas, 187, 237
Tieghem, 133
Tiempos de exposición, 67
Tiempos de fijación, 126, 128, 130
Timol, 175, 213
Tinciones, *cf.* Coloraciones
Tinta China, 205, 221, 308, 311, 312
Tinta-Verde, Luz-Sudán III, 260
Tiocarbamida nitroazul de tetrazolio, 212
Tiocianato, 227
Tiocianato de azul de metileno, 207
Tiocromo, 257
Tioflavina, 191, 193, 213
Tionina, 187, 206, 212, 230, 349
Tionina paraldehído, 228
Tiraje, 68, 69
Tirosinasa, 237
Titanio, 226
Tolueno, 348
Tomavistas, 64
Tomofotómetro, 91
Tonalidad, 5
Tornillo micrométrico, 21, 22
Transposición de contrastes, 68
Tranzer, 235
Trasvasamiento brusco, 309
Treponemas, 305-307
Triácido, *cf.* Tricrómicos competitivos
Triarilmetanos, 188
Tricloroetileno, 146, 147, 348
Tricloruro de antimonio, 257
Tricohialina, 252
Tricromazán, 244
Tricrómico triácido, 245
Tricrómicos, 238, 244, 245, 320
Tricrómicos competitivos, 218, 251
Tricromo, 4
Tricromoósmico, 126
Tricromoósmico acético, 126
Tricromoósmico ácido fuerte, 125
Trinitrofenol, *cf.* Ácido pícrico
Trióxido de cromo, 122, 132
Trioxihemateína férrica, 242
Trioxihemateína propiónica, 242
Tripaflavina, 195, 208, 230
Tripanoplasmas, 292
Tripanosomas, 292
Triple centrifugación, 293
Trombocitos, 92, 187
Tropeolina anaranjada, 195, 200, 205, 206, 210, 212
Trueta, 222
Tubo de Borrel, 146
Tubos polínicos, 186, 188, 189
Tubos uriníferos, 184
Tullberg, 119
Tumores, *cf.* Células cancerosas
Tunicina, 252, 264
Turba, 256
Turchini, 254
Türk, 93
Twort, 220
Tyrode, 348, 354

Ultracentrifugación, 113
Ultrafiltración, 219
Ultrasones, 143
Ultravioleta, 3, 4, 39, 114
Ultropak, 37
Unna, 238, 246
Uranilo, *cf.* Uranio
Uranilo-formol, 128
Uranina, 193
Uranio, 226
Urato, 227
U.V., *cf.* Ultravioleta

Vacuoma, 135, 259
Vanbreuseghem, 271
Vapor de mercurio, 16
V.E.B. Iena, 15
Vehículo óptico, 54
Veneno de alizarina, 182, 195
Verde Alcián, 187, 195
Verde Binchnschedler, 197
Verde brillante, 188, 198, 201, 202, 206, 211, 213
Verde brillante fenicado-tanino-safranina, 313
Verde Erio, 196
Verde esmeralda, 191
Verde Guinea, 195, 205, 210
Verde intenso FCF, 188, 203, 204, 326

Verde intenso O, 203
Verde Janus, 183, 322, 349
Verde Janus azulado, 205, 213
Verde Lanacilo, 206
Verde lana, 213
Verde lana sulfurín, 195, 199, 201, 203, 210, 214
Verde luz, 188, 195, 203, 206, 213, 322, 349
Verde luz-Sudán III, 260
Verde luz-Sudán-Hemalumbre, 260
Verde malaquita, 187, 208, 211, 213, 343
Verde malaquita-Rojo Congo, 261
Verde naftaleno, 206, 207, 210
Verde naftoeromo, 190, 207
Verde naftol amarillento, 203, 207
Verde naftol azulado, 186, 195, 205, 207, 213
Verde naftol B, 187
Verde Sudán azulado, 211
Verde Victoria amarillento, 213
Verde yodo, 189, 205, 267
Verde de etilo, 189, 202
Verde de metileno, 188, 207
Verde de metilo, 199, 201, 206, 267, 349
Verde de metilo purificado, 238, 267
Vermellón, 191, 199, 200, 210
Verne, 266
Vernier, 82
Verocay, 255
Veronal sódico, *cf.* Dietilmalonilurea
Vestopal, 153
Violeta Astra, 196
Violeta ácido intenso, 203, 213
Violeta ácido intenso rojizo, 190, 213
Violeta ácido muy azul, 195, 203
Violeta ácido muy rojo, 195
Violeta ácido de alizarina, 194, 200, 211, 213
Violeta amatista, 196, 204, 205
Violeta Benzo intenso, 197, 199, 201, 202, 204, 213
Violeta fenicado y otros, 313
Violeta Hoffmann, 189, 190, 201, 205, 210, 213
Violeta intenso azulado, 185, 201, 204, 207, 213
Violeta lanocilo azul pálido, 210
Violeta moderno, 207
Violeta neutro, 208, 260, 267
Violeta rojo intenso, 203
Violeta Sudán, 199
Violeta de alfanaftol, 208
Violeta de antraquinona, 195, 196
Violeta de Bencilo, 197
Violeta de Bernthsen, 197, 207
Violeta de cresil, 187, 200
Violeta de cresil intenso, 200
Violeta de cromo, 195, 196, 200, 202, 213
Violeta de etileno, 207
Violeta de etilo, 189, 203
Violeta de formilo, 189, 202, 204, 210
Violeta de metileno, 188, 201, 207, 211
Violeta de metilo, 189, 201, 204, 207, 209, 213, 230
Violeta de metilo N azul, 313
Violeta de tretrazolio, 212
Viraje, 69
Visión, 24
Vitamina A, 257
Vitamina C, 257
Vocabulario técnico, 330
Voorhoeve, 255

Walpole, 141, 142
Warthin-Starry, 303
Wiegert, 220
Wild-Heerbrugg, 6, 12, 13, 15, 18, 37, 44, 46, 52, 72-75, 94
Wilska, 41
Wollaston, 42, 43
Wratten, 62, 65, 114, 116, 344, 345, 349
Wright, 220, 246

Xantenos, 190
Xantoproteica, 262
Xenón, 17
Xilol, 348
Xilol fenicado, 147
Xilol yodomercúrico, 238
Xilol-Creosota fenicada, 146, 147

Yodado, 227
Yodo, 191, 233, 238, 252, 267
Yodofilia, 238
Yodoglicerocloral, 175
Yodohidrato de hemateína, 256
Yoduro, 227
Yoduro de Hg-K, 348
Yoduro de metilo, 348
Yoduro de Zn, 348
Young, 2

Zabel, 308
Zacharias, 234, 262
Zeiss, 42, 138
Zender, 41
Zenker, 125, 126, 323
Zernike, 41, 43
Ziedentopf, 35
Ziehel, 249, 254, 272, 302, 314
Zinc, 226
Zinc-leucos, 235
Zincon proformazon, 214
Zoopatología, 309

Observaciones. — La mayoría de los nombres propios asociados a los colorantes o a las técnicas se han convertido en nombres familiares; nos ha parecido inútil diferenciarlos gráficamente en este índice.

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

EX LIBRIS Scan Digit

The Doctor

http://thedoctorwho1967.blogspot.com.ar/

http://el1900.blogspot.com.ar/

http://librosrevistasinteresesanexo.blogspot.com.ar/

https://labibliotecadeldrmoreau.blogspot.com/

MANUAL DE MICROSCOPIA

Marcel Locquin
Maurice Langeron